

KLINIKUM CHARLOTTENBURG
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN
STRAHLENKLINIK UND POLIKLINIK
GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR: PROF. DR. U. HAUBOLD

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR BLEOMYCIN-BESTIMMUNG
IN ORGANEN**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dr.-Ing. Wolfgang Rüdinger
Spreeau

1983



KLINIKUM CHARLOTTENBURG DER FREIEN UNIVERSITÄT
STRAHLENKLINIK UND POLIKLINIK
GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR: PROF. DR. U. HAUBOLD

U N T E R S U C H U N G E N Z U R
B L E O M Y C I N - B E S T I M M U N G I N O R G A N E N

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dr.-Ing. Wolfgang Rüdinger
Spreeau

Referent: Prof. Dr. U. Haubold

Korreferent: Prof. Dr. W. Christ

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 4. 3. 83

INHALTSVERZEICHNIS

=====

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Material und Methodik</u>	2
B.I. Aufbau des Radioimmunassays für BLM	2
B.I.1. Immunisierungsverfahren	2
B.I.2. Markierung von BLM mit ^{57}Co	3
B.I.3. Ermittlung des Antikörpertiters	4
B.I.4. Aufnahme von Standardkurven	6
B.I.5. BLM-Bestimmung im Serum	9
B.I.6. Markierung von BLM mit ^{125}J	10
B.II. Organhomogenisierung	12
B.II.1. Bestimmung des Homogenat-Proteingehaltes ..	12
B.III. Zellkernisolierung	13
C. <u>Ergebnisse</u>	14
C.I. Radioimmunassay von BLM in Rattenorgan-	
homogenaten	14
C.I.1. Aufnahme von Standardkurven unter Zusatz	
von Organhomogenaten	14
C.I.2. Aufnahme von Homogenat-Standardkurven	
ohne Antiserumzugabe	16
C.II. Kinetik von $^{57}\text{CoCl}_2$, ^{57}Co -BLM und BLM	
in Leber und Niere	18
C.II.1. Versuchsaufbau	18
C.II.2. Ergebnisse	18
C.II.2.1. Radioaktivitätsverteilung von $^{57}\text{Co}(\text{Cl}_2)$	
und ^{57}Co (-BLM)	19
C.II.2.2. Kinetik von immunreaktivem BLM	21
C.III. Speicherung von ^{125}J -BLM, ^{57}Co -BLM und	
$^{57}\text{CoCl}_2$ in Organhomogenaten und deren	
Kernfraktionen in vivo	22
C.III.1. Versuchsaufbau	22
C.III.2. Ergebnisse	23
C.IV. Beladung der Zellkerne in vitro	25
C.IV.1. Beladung mit ^{57}Co (-BLM)	25

	Seite
C.IV.2.	Beladung mit $^{125}\text{J}(-\text{BLM})$ 26
C.V.	Kinetik von $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ in Lungen- homogenat und -zellkernen 27
C.VI.	Radioimmunologische Bestimmung von BLM im Zellkern 28
C.VII.	Aufbau eines Kernrezeptor-Assays 29
C.VII.1.	Allgemeine Voraussetzungen 29
C.VII.2.	Kernbeladungskapazität für $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ 29
C.VII.2.1.	Abhängigkeit von der Verdünnung der Kernemulsion 29
C.VII.2.2.	Abhängigkeit von der Konzentration der ^{57}Co -BLM-Lösung 31
C.VII.2.3.	Aufnahme von Standardkurven 32
D.	<u>Theoretischer Teil</u> 34
D.I.	Modellrechnung zum Radioimmunassay zur BLM-Messung in Homogenaten 34
D.I.1.	Postulat I: 2-bindiger Antikörper - starke Antigen-Antikörperbindung 34
D.I.2.	Postulat II: 2-bindiger Antikörper - starke Homogenat-Antigenbindung 37
D.I.3.	Postulat III: 5-bindiger Antikörper - starke Antigen-Antikörperbindung 39
D.I.4.	Postulat IV: 5-bindiger Antikörper - starke Homogenat-Antigenbindung 40
D.I.5.	Kalkulation der Bindungskurven für kombinierte Antigen-Antikörper- und Antigen-Homogenat-Bindung aus den Einzelbindungen 42
D.II.	Linearisierung der Bindungskurve 46
D.II.1.	Theoretische Grundlagen 46
D.II.2.	Experimentelle Überprüfung 46
E.	<u>Diskussion der Ergebnisse</u> 48
	<u>Zusammenfassung</u> 58
	<u>Literaturverzeichnis</u> 60

A. EINLEITUNG

Das von Hamao Umezawa [35] entdeckte und beschriebene zyto-
statisch wirksame Antibiotikum BLEOMYCIN (BLM) wird klinisch
hauptsächlich gegen Plattenepithelkarzinome eingesetzt.
Seine Effektivität korreliert mit der Konzentration im ma-
lignen Gewebe. BLM inhibiert in geringen Konzentrationen die
DNS-Polymerase [20] und bewirkt in höheren Konzentrationen
Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNS [32]. Aus der organ-
abhängigen Inaktivierung resultiert die bevorzugte Wirkung
dieses Zytostatikums auf Plattenepithelkarzinome [25].

In den vergangenen 10 Jahren wurde eine Reihe von Organver-
teilungsstudien zur Dosierungsoptimierung wegen der Gefahr
einer sich ausbildenden Lungenfibrose beschrieben [2], [33],
[15], [38], [37], [3], [4] und [13], [6], [12], [28], [1].
Verwendet wurde häufig ^{57}Co -BLM, da diese Verbindung leicht
zu gewinnen und zu handhaben ist. Von der Stabilität der
Metallkomplexe in vivo ist die Aussagekraft derartiger Unter-
suchungen abhängig. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich
mit dieser Problematik.

Den Hauptteil der Arbeit stellen methodische Untersuchungen
zur BLM-Bestimmung in Organhomogenaten dar. In diesen Rahmen
ist auch der Aufbau eines Kernrezeptor-Assays einzuordnen,
mit dem im Prinzip an die Kernmembran in vivo gebundenes BLM
direkt bestimmt werden kann. Durch dieses Verfahren kann die
zytoplasmatische Inaktivierung von BLM während der notwendi-
gen Inkubationszeit des ebenfalls durchgeführten Radioimmun-
assays zur Bestimmung von BLM im Organhomogenat umgangen
werden.

Weiterhin wurde durch eine Modellrechnung zum Radioimmunassay
die Bindungsaffinität von Organhomogenaten und Serumanti-
körpern zu BLM näher untersucht.



B. MATERIAL UND METHODIK =====

B.I. AUFBAU DES RADIOIMMUNASSAYS FÜR BLM

Der Aufbau des Radioimmunassays (RIA) erfolgte weitgehend nach einer Vorschrift von Elson et al. [11]. Sowohl für die Herstellung des BLM-Humanserumalbuminkonjugates (BLM-HSA), als auch für die Einstellung des ⁵⁷Co-markierten Bleomycin-tracers und der BLM-Standardlösungen wurde handelsübliches Bleomycinum Mack^(R) (BLM) verwendet.

Eine Ampulle lyophilisierte Trockensubstanz Bleomycinsulfat enthält BLM entsprechend einer standardisierten biologischen Aktivität von 15 mg BLM.

B.I.1. IMMUNISIERUNGSVERFAHREN

Entsprechend der oben zitierten Arbeit von Elson et al. wurde BLM zur Immunisierung von zwei Kaninchen (New Zealand) durch katalytische Einwirkung von 2-äthyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid [14] an Humanserumalbumin gekoppelt, wodurch BLM als Hapten fungiert.

Reaktionsvorschrift:

1. 50 mg HSA (200 µl 25%-HSA-Lösung) werden mit 20 ml sterilem destillierten Wasser verdünnt.
2. Lösen von 5 mg 2-äthyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid in Lösung 1.
3. Zufügen von 15 mg standardisiertem BLM-Lyophilisat unter 24-stündigem Rühren bei Raumtemperatur.
4. Abzentrifugieren und dreimaliges Waschen des Zentrifugates in destilliertem sterilen Wasser.

100 µg des gereinigten Zentrifugates wurden in 100 µl 0,9%-iger NaCl-Lösung unter Hinzufügen von 100 µl komplettem Freundschem Adjuvans emulgiert.

Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte durch intramuskuläre Injektion des Konjugates in alle vier Extremitäten und anschließender zweimaliger Boosterung mit gleichen Antigenmengen im Abstand von vier Wochen [36].

Merétey und Kocsár [18] beschrieben starke lokale Reizreaktionen bei Impfung von Kaninchen in die Fußsohlen, ohne daß jedoch eine stärkere Antikörperreaktion beobachtet wurde. Auf diese häufig angewendete Applikationsart wurde aus diesen Gründen verzichtet.

Die gewonnenen Seren wurden portionsweise bei -20 °C aufbewahrt.

B.I.2. MARKIERUNG VON BLM MIT ^{57}Co

Markierungsvorschrift:

1. Versetzen von 100 µl einer BLM-Lösung (250 µg BLM/ml) mit 500 µCi trägerfreiem $^{57}\text{CoCl}_2$.
2. Verdünnen der Lösung mit 1 ml einer 0,5 M Phosphatpufferlösung, pH = 7,4.
3. Verdünnen der Lösung 2 auf ein Endvolumen von 10 ml mit einer 10 mM Phosphatpufferlösung, pH = 7,4 und einem 0,15 M NaCl-Gehalt (PBS-Puffer).
4. Weiteres Verdünnen der entstandenen Lösung um den Faktor 500 mit PBS-Puffer. Es resultiert damit eine Arbeitslösung mit einer spez. Aktivität von 1 µCi ^{57}Co -BLM/10 ml. (Tracer)

Der Markierungsgrad beträgt 5,3 %.

100 μ l dieses Tracers wurden für den Radioimmunassay pro Probe eingesetzt. Diese Menge entspricht einer Aktivität von 10^{-2} μ Ci und einer BLM Menge von $5 \cdot 10^{-10}$ g (10^{-2} μ Ci $\hat{=}$ 370 Bq).

Die Aktivitätsmessung von 100 μ l des Tracers mit dem zur Verfügung stehenden automatischen Gammazähler (Typ Berthold BF 2303) im eingestellten ^{57}Co -Fenster ergab eine mittlere Zahlrate von $15\,950 \pm 205$ Imp/min.

Die Empfindlichkeit des Gammazählers beträgt somit:

$$\begin{aligned} 100\,000 \text{ Imp/min} &\hat{=} 6,3 \cdot 10^{-2} \mu\text{Ci } ^{57}\text{Co} \quad \text{oder} \\ 1587 \text{ Imp/min} &\hat{=} 1 \text{ nCi } ^{57}\text{Co} . \end{aligned}$$

Die Zählausbeute $\frac{\text{cps}}{\text{dps}}$ beträgt damit 71,5 %.

B.I.3. ERMITTLUNG DES ANTIKÖRPERTITERS

Zur Ermittlung des Antikörpertiters der Kaninchenseren wurden zusammen inkubiert:

100 μ l Tracer
und 200 μ l Antiserum, verdünnt mit PBS-Puffer, 1 % BSA
entsprechend Tabelle 1 .

Die Inkubationszeit betrug 60 min bei 37 °C.

Die Antigen-Antikörperkomplexe des Reaktionsansatzes wurden anschließend durch Zugabe von 1 ml einer 20 gewichtsprozentigen Polyäthylenglycollösung (PEG) mit einem mittleren Molekulargewicht von 6000 ausgefällt [8] und bei 4 °C abzentrifugiert.

Die Tabellen 1 und 2 zeigen die Aktivitäten der abzentrifugierten und in PBS-Puffer gewaschenen Immunkomplexe, die Aktivitäten der nach Zentrifugation überstehenden Lösungen und die daraus resultierende prozentuale Bindung von ^{57}Co -BLM

durch die Antikörper in Abhängigkeit von der Antiserumverdünnung.

B_0 = gebundene Aktivität, ohne kompetitive Verdrängung des ^{57}Co -BLM durch Standard- oder Probenantigene

T = eingesetzte Traceraktivität

Serum- verdünnung	[Imp/min] Radioaktivität des Niederschlages	[Imp/min] Radioaktivität des Überstandes	B_0/T [%]
1 : 30	17 298	436	97,5
1 : 60	14 956	2 044	87,8
1 : 120	4 895	10 877	31,0
1 : 240	1 108	13 754	7,5
1 : 480	678	14 453	4,5
1 : 960	459	14 761	3,6

Tabelle 1: Gebundene und freie Aktivitäten in Abhängigkeit von der Verdünnung des Antiserums des 1. Kaninchens

Die Immunisierung des zweiten Kaninchens ergab folgende Resultate:

Serum- verdünnung	[Imp/min] Radioaktivität des Niederschlages	[Imp/min] Radioaktivität des Überstandes	B_0/T [%]
1 : 100	12 832	2 726	82,4
1 : 200	8 837	6 524	57,5
1 : 400	4 521	9 895	31,3
1 : 800	2 467	11 330	17,8
1 : 1600	1 631	11 785	12,1

Tabelle 2: Gebundene und freie Aktivitäten in Abhängigkeit von der Verdünnung des Antiserums des 2. Kaninchens

Erfahrungsgemäß sind bei einer initialen Tracerbindung B_0/T von etwa 70 % gute Ergebnisse mit einem Radioimmunassay erreichbar. Es ist für eine geringe unspezifische Bindung eine

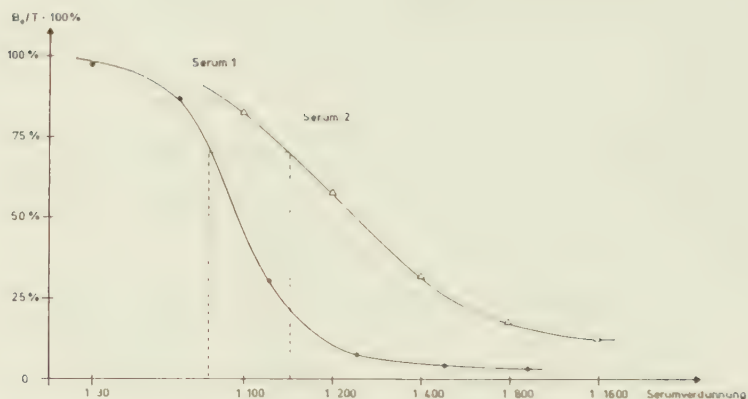


Abb. 1: Tracerbindung in Abhängigkeit von der Serumverdünnung. Die Immunisierung des 2. Kaninchens (Serum 2) ergab bessere Resultate, so daß für eine 70%-ige Tracerbindung mit einer Verdünnung von 1 : 150 gearbeitet werden kann.

möglichst hohe Serumverdünnung anzustreben. Im weiteren wurde daher mit dem Serum des zweiten immunisierten Kaninchens bei einer Verdünnung von 1 : 150 (vgl. Abb. 1) gearbeitet.

B.I.4. AUFNAHME VON STANDARDKURVEN

Die BLM-RIA-Standardkurven wurden nach folgendem Schema angesetzt:

- 100 µl Tracer (vgl. S. 3)
- 200 µl Antiserum (aus Kaninchen 2, Verdünnung 1 : 150)
- jeweils 25 µl BLM-Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 10^{-7} g BLM/ml bis 10^{-4} g BLM/ml .

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert, der entstehende Immunkomplex mit 1 ml 20-gewichtsprozentiger PEG-Lösung ausgefällt, abzentrifugiert und mit PBS-Puffer gewaschen.

Aus jedem Röhrchen wurden sowohl der Überstand, als auch das Zentrifugat im Gammazähler vermessen, um eventuelle Pipettierfehler zu erkennen. Die unspezifische Bindung, d.h. die prozentual gefällte Aktivität nach alleiniger Inkubation von Tracer und BLM-Standard betrug aus 12 gemittelten Versuchen $6,7 \pm 0,2 \%$.

Der BLM-RIA arbeitete zufriedenstellend im Bereich von ca. $0,5 \cdot 10^{-7}$ g BLM/ml bis 10^{-4} g BLM/ml, bzw. bei dem Probenvolumen von 25 μ l in einem Mengenbereich von 1,25 ng bis 500 ng BLM. Die erreichte Empfindlichkeit war damit etwas höher als die von Elson et al. publizierte [11].

In Tab. 3 und Abb. 2 sind die Standardkurve und im Vergleich dazu die Standardkurven bei einer Antiserumverdünnung von 1:100 bzw. 1:200 dargestellt:

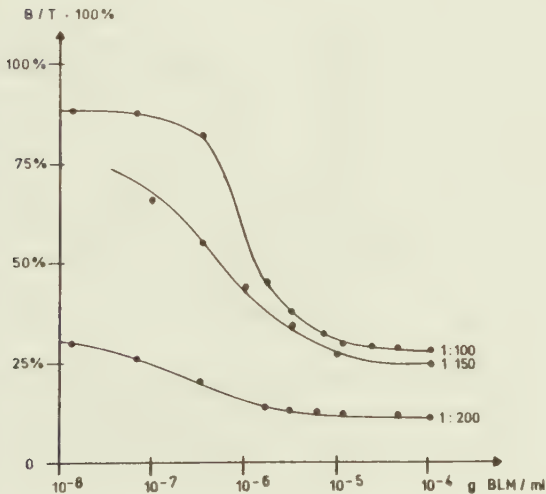


Abb. 2: BLM-RIA Standardkurven für verschiedene Antiserumverdünnungen.
Für die Verdünnung 1:150 zeigt sich für BLM-Konzentrationen von 1 bis $100 \cdot 10^{-7}$ g/ml ein Meßbereich mit annähernd gleichbleibender Empfindlichkeit.

(B = gebundene Aktivität bei kompetitiver Verdrängung des ^{57}Co -BLM durch den BLM-Standard)

Konzentration des Bleomycinstandards	B/T • 100 %	B/B ₀
0	90,0 %	1,00
$0,13 \cdot 10^{-7}$ g/ml	88,3 %	0,98
0,67	87,1 %	0,98
3,37	89,0 %	0,99
16,87	45,4 %	0,50
33,87	37,9 %	0,42
67,50	31,8 %	0,36
125,00	30,2 %	0,33
250,00	29,1 %	0,32
500,00	28,7 %	0,32
1000,00	28,0 %	0,31
Serumverdünnung: 1 : 100		
0	79,9 %	1,00
$1,00 \cdot 10^{-7}$ g/ml	66,7 %	0,83
3,33	55,6 %	0,70
10,00	44,7 %	0,56
33,33	34,2 %	0,43
100,00	28,0 %	0,35
1000,00	24,5 %	0,32
Serumverdünnung: 1 : 150		
0	32,0 %	1,00
$0,13 \cdot 10^{-7}$ g/ml	30,1 %	0,94
0,67	26,3 %	0,81
3,37	19,9 %	0,63
16,87	14,2 %	0,44
33,75	13,1 %	0,41
67,50	13,0 %	0,41
125,00	12,1 %	0,38
250,00	11,9 %	0,38
500,00	12,0 %	0,38
1000,00	11,4 %	0,36
Serumverdünnung: 1 : 200		

Tabelle 3: Alle aufgeführten Werte sind das Ergebnis einer Mittelung der Resultate von zwei gleichen Ansätzen, die gemeinsam inkubiert wurden.

B.I.5. BLM-BESTIMMUNG IM SERUM

Zur Erprobung des BLM-Assays wurde entsprechend der Vorschrift von S. 6 eine weitere Standardkurve zur Bestimmung der BLM-Konzentration im Serum aufgenommen. Es wurde einer Ratte mit einem Lebendgewicht von 305 g $5 \cdot 10^{-4}$ g BLM (in 100 μ l) in die Schwanzvene injiziert. Die Blutentnahme erfolgte 85 min p.i. und ergab eine mittlere BLM-Konzentration von $1,0 \cdot 10^{-5}$ g BLM/ml Serum (Abb. 3).

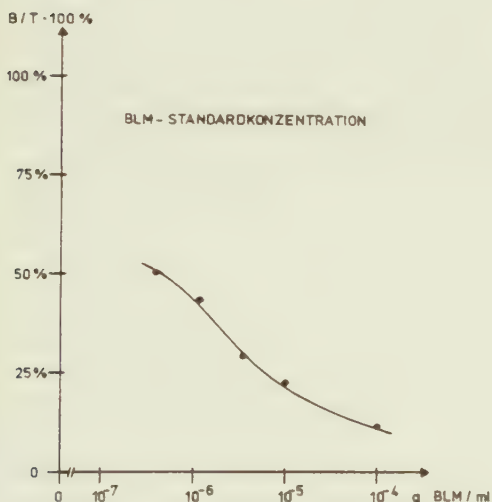


Abb. 3: BLM-Standardkurve zur Bestimmung der Serumkonzentration

Zur Kontrolle des Ergebnisses wurde die BLM-Serumkonzentration bei 3 Serumverdünnungen gemessen. Die Verdünnung erfolgte durch PBS-Puffer (Tab. 4).

Verdünnungsfaktor des Serums	gemessene BLM-Serumkonzentration
2	$51,3 \cdot 10^{-7}$ g BLM/ml
5	$21,1 \cdot 10^{-7}$ g BLM/ml
10	$9,2 \cdot 10^{-7}$ g BLM/ml

Tabelle 4

Das Blutvolumen der Ratte ist aus dem Körpergewicht abzuschätzen [31]:

$$\text{Blutvolumen} = 60 \text{ ml / kg Körpergewicht} .$$

Damit resultiert ein Blutvolumen von etwa 20 ml bzw. etwa 11 ml Serum bei einem für eine gesunde Ratte angesetzten Hämatokrit von 46 Vol% [31].

Setzt man voraus, daß zum Zeitpunkt der Injektion das gesamte BLM ausschließlich auf das Serumvolumen verteilt ist, so nahm in den 85 min die Serumkonzentration um den Faktor 4,6 ab. Fordert man weiterhin für das Zeitintervall einer 4-fachen bis 4,6-fachen Konzentrationsabnahme einen linearen Verlauf, so wird die BLM-Konzentration auf 1/4 ihres Ausgangswertes nach 74 min abgesunken sein. Daraus ergibt sich in erster Näherung für die Halbwertszeit:

$$t_{1/2, \text{ Serum}} = 37 \text{ min.}$$

B.I.6. MARKIERUNG VON BLM MIT ^{125}J

Jodid geht mit BLM unter oxydativen Bedingungen eine kovalente Bindung ein, die in vitro und in vivo eine hohe Stabilität besitzt [10], [30].

Die Markierung mit ^{125}J erfolgte nach folgender Reaktionsvorschrift:

1. Lösen von 15 mg BLM in 1,5 ml isotonischem Phosphatpuffer, pH 7,5.
2. Zusetzen von 30 μl 3,3 mM JCl-Lösung.
3. Zusetzen einer Na ^{125}J -Lösung entsprechend einer Aktivität von 500 μCi (Sodium Iodine for Protein

Iodination in NaOH solution - IMS 30, Batch 2 BG - Amersham).

4. Inkubation bei Zimmertemperatur unter Rühren für 1 Std.
5. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von einem Tropfen einer 1 M NaHSO_3 -Lösung.
6. Abtrennen des isolierten BLM über eine mit HCl gespülte Amberlite-IRA 400 Säule (0,008 N HCl).

Die Reinheit des jodierten BLM wurde durch Gammaskopie bestätigt. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches erfolgte dünnschichtchromatographisch (feste Phase: Silikagel 60; flüssige Phase: 100%-ige Ammoniumacetat-Lösung - Methanol im Verhältnis 1 : 1).

B.II. ORGANHOMOGENISIERUNG

Für die Gewinnung der im weiteren eingesetzten Organhomogenate aus Ratten wurde ein mechanisches Homogenisierungsverfahren angewendet. Sofort nach Tötung der Tiere erfolgte die Organentnahme und deren Weiterverarbeitung im Eisbad. Die mit einer Schere zerkleinerten Organe wurden in PBS-Puffer (pH 7,4) nach Potter [26] homogenisiert. Die Homogenisierungswärme wurde durch Eisbadkühlung abgeführt.

Das Homogenat wurde zur Abtrennung bindegewebiger faseriger Reste durch ein grobmaschiges Gazetuch filtriert.

B.II.1. BESTIMMUNG DES HOMOGENAT-PROTEINGEHALTES

Die Proteinkonzentrationen der Homogenate wurden photometrisch nach der Biuret-Methode bestimmt [9].

Für die Homogenisierung wurden 2 g frisch entnommenes Nierengewebe und 10 g Lebergewebe in jeweils 20 ml PBS-Puffer, pH 7,4, aufgenommen. Zum Radioimmunassay in Kap. C.I. wurde diese Suspension in verschiedenen Verdünnungen zugesetzt. Die dabei resultierenden Proteinkonzentrationen sind in Tab. 5 aufgeführt (als Verdünnungsmedium diente PBS-Puffer, pH 7,4, die Verdünnung erfolgte um den Faktor 5, 15 oder 25).

	Proteingehalt [g Protein/l]		
Verdünnungen der Leberhomogenat-suspensionen:	53,17 ± 0,44	10,63 ± 0,11	3,63 ± 0,07
Verdünnungen der Nierenhomogenat-suspensionen:	11,36 ± 0,23	2,66 ± 0,11	0,48 ± 0,06

Tabelle 5

B.III. ZELLKERNISOLIERUNG

Die Kernisolierung erfolgte nach Modifikation der Vorschrift von Blobel und Potter [5].

Die den Ratten entnommenen Organe wurden sofort in eisgekühltem TKM-Puffer (0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 bei 20 °C, 0,25 M Saccharose, 0,025 M KCl und 0,005 M $MgCl_2$) aufgenommen. Die weitere Organverarbeitung erfolgte zur Unterdrückung enzymatischer Reaktionen im Eisbad. Die Organe wurden ausgewogen, in kleine Stücke geschnitten und jeweils definierte Mengen, wie auf S. 12 beschrieben, homogenisiert.

Vorschrift zur Zellkernfraktionierung:

1. Homogenisierung von 0,8 g zerkleinertem Organ in 3 ml TKM-Puffer.
2. Verdünnen des Homogenates mit 6 ml 2,3 M Saccharose-lösung (es resultiert eine Lösung mit einer etwa 1,65 M Saccharosekonzentration).
3. Unterschichten von 3,5 ml dieser Homogenatverdünnung mit 1,5 ml einer 2,3 M Saccharoselösung in einem Zentrifugierröhrchen.
4. Ultrazentrifugation bei 4 °C, 203 000 g 45 min lang.
5. Waschen des Pellets mit TKM-Puffer und anschließender Aufnahme in 10 ml TKM-Puffer unter Zusatz von 1 Vol% Triton X als Emulgator.

Aufgrund ihrer Dichte vermögen nur die Zellkerne durch die 2,3 M Saccharoselösung zu sedimentieren. Alle übrigen Zellbestandteile befinden sich im Überstand und können nach der Zentrifugation leicht abgetrennt werden.

Die nach dieser Vorschrift gewonnene Kernemulsion stellt die Grundlage für die im Kap. C beschriebenen Versuche dar. Ihr Verdünnungsgrad wird mit 1 bezeichnet.

Die Ultrazentrifugation wurde im Immunologisch-serologischen Labor des Klinikums Charlottenburg in Berlin durchgeführt.

C. E R G E B N I S S E

=====

C.I. RADIOIMMUNASSAY VON BLM IN RATTENORGANHOMOGENATEN

Um die Störwirkung der Organhomogenate durch Enzymreaktionen oder Elektrolytverschiebungen auf die Bindung zwischen BLM und die Serumantikörper zu erkennen, wurden den RIA-Ansätzen zur Aufnahme der BLM-Standardkurven jeweils 25 µl eines Organhomogenates mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (s. Tab. 5) zugesetzt.

C.I.1. AUFNAHME VON STANDARDKURVEN UNTER ZUSATZ VON ORGANHOMOGENATEN

Ansatz für die Aufnahme der Standardkurven:

100 µl Tracer (s. S. 3)
200 µl Antiserum, Verdünnung 1 : 150 (s. S. 9)
25 BLM-Standard
und 25 µl Nieren- bzw. Leberhomogenat (s. Tab. 5)
(Inkubation: 2 Std. bei 37 °C)

Zum Vergleich erfolgte die Aufnahme einer Kontrollbindungskurve ohne Zugabe von Organhomogenaten.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 4 und 5 dargestellt.

Erkennbar ist eine gegenüber den Kontrollwerten ohne Homogenatzugabe vermehrte Aktivität des Präzipitates bei allen Bindungskurven, die unter Homogenatzusatz aufgenommen wurden. Bei schrittweiser Verdünnung der Homogenate gleichen sich die Assaykurven der Kontrollstandardkurve an.

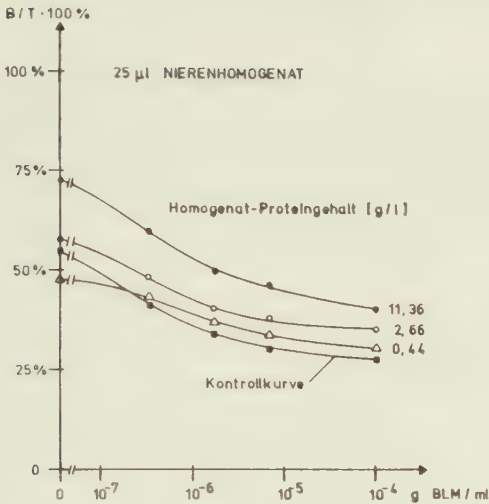


Abb. 4: BLM-Standardkurven bei Zugabe von Nierenhomogenaten mit verschiedenen Proteinkonzentrationen. Die Kontrollkurve zeigt den Verlauf der gebundenen Aktivität ohne Homogenatzugabe.

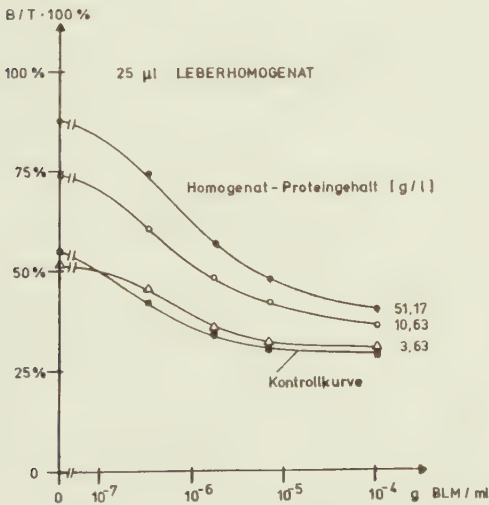


Abb. 5: BLM-Standardkurven bei Zugabe von Leberhomogenaten (analog zu Abb. 4).

C.I.2. AUFNAHME VON HOMOGENAT-STANDARKURVEN OHNE ANTISERUM-
ZUGABE

Zur Klärung der Bindungsverstärkung durch die Homogenate in den Abb. 4 und 5 wurden in weiteren Versuchen Standardkurven ohne Antiserumzugabe aufgenommen. Durch diese Versuchsanordnung kann die Bindungsfähigkeit der Homogenate für ^{57}Co -BLM ermittelt werden. Die Ansätze erfolgten durch Inkubation von:

100 μl Tracer
25 μl BLM-Standard
und 25 μl Homogenatsuspension.

Die Inkubationszeit betrug 2 Std. bei 37 °C. Die Ergebnisse sind in den Abb. 6 und 7 dargestellt.

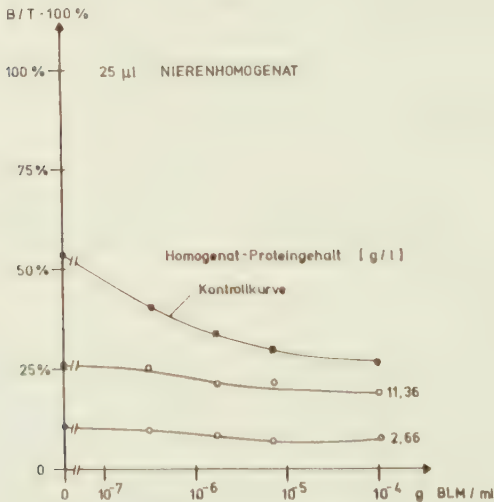


Abb. 6: BLM-Standardkurve bei Zugabe von Nierenhomogenaten, jedoch ohne Zugabe von Antiseren. Die Kontrollkurve entspricht der in Abb. 4 bzw. 5 (Ansätze zu den Abb. 4 bis 7 wurden gemeinsam inkubiert).

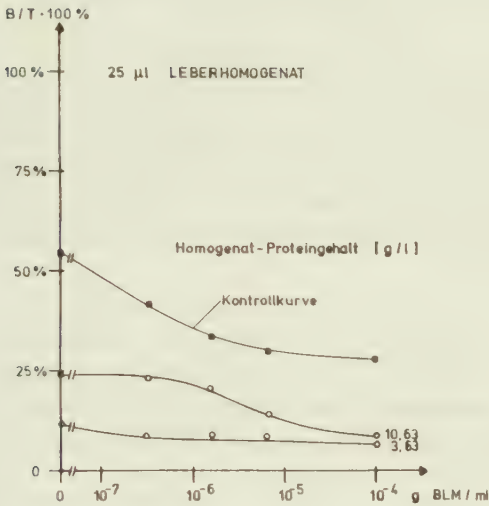


Abb. 7: BLM-Standardkurve bei Zugabe von Leberhomogenaten (keine Zugabe von Antiserum).

Analog zu den Kurven 4 und 5 ist nach Zugabe von Homogenaten zu den Inkubationsansätzen in Abb. 6 und 7 eine deutliche Bindung von ⁵⁷Co-BLM bzw. BLM durch die Homogenate erkennbar.

C.II. KINETIK VON $^{57}\text{CoCl}_2$, $^{57}\text{Co-BLM}$ UND BLM IN LEBER UND NIERE

C.II.1. VERSUCHSAUFBAU

Jeweils 5 Ratten (White wistar, 350 g, gleichaltrig, 3 Mo., ♂) wurden $^{57}\text{CoCl}_2$, $^{57}\text{Co-BLM}$ bzw. BLM in eine der 4 Schwanzvenen injiziert. Hierbei wurden die Ratten in einem Injektionskäfig fixiert. Die Tötung und Organentnahme erfolgte nach 1, 2, 4, 8 und 25 Std.

Die $^{57}\text{CoCl}_2$ - und die $^{57}\text{Co-BLM}$ -Injektionslösungen waren auf eine Aktivität von 3,0 μCi bzw. 2,6 μCi eingestellt. Die applizierte BLM-Menge entsprach sowohl bei $^{57}\text{Co-BLM}$ als auch bei nicht markiertem BLM einer biologisch aktiven Menge von 1,5 mg BLM.

Die entnommenen Organe wurden sofort nach Entnahme bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren (in PBS-Puffer).

C.II.2. ERGEBNISSE

Ein definierter Vergleich der gemessenen Aktivitäten in den verschiedenen Organen ist durch die Einführung eines Aktivitätsverteilungsfaktors (AVF) möglich. Dieser Faktor wurde definiert als die im Organ gespeicherte Aktivität in Prozenten der injizierten Aktivität bezogen auf das Organgewicht in Prozenten des Körpergewichtes. Durch diesen Faktor werden sowohl unterschiedliche Injektionsmengen als auch Organgewichte und Körpergewichte eliminiert.

$$\text{AVF} = \frac{\text{Organaktivität}}{\text{injizierte Aktivität}} : \frac{\text{Organgewicht}}{\text{Körpergewicht}}$$

$$\text{bzw.} \quad \text{AVF} = \frac{\text{Kernaktivität des Organs}}{\text{injizierte Aktivität}} : \frac{\text{Organgewicht}}{\text{Körpergewicht}}$$

C.II.2.1. RADIOAKTIVITÄTSVERTEILUNG VON $^{57}\text{Co}(\text{Cl}_2)$ UND $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$

Die zeitliche Abhängigkeit der Radioaktivitätsanreicherung wurde mit dem bereits beschriebenen automatischen Gammazähler ermittelt. Gemessen wurde somit nur die Verteilung des Nuklids ^{57}Co , nicht jedoch die von $^{57}\text{CoCl}_2$ oder $^{57}\text{CoBLM}$. Diese Einschränkung wird im folgenden durch die Schreibweise $^{57}\text{Co}(\text{Cl}_2)$ und $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ kenntlich gemacht.

Die normierten Ergebnisse sind in Tab. 6 und Abb. 8 aufgeführt:

Zeit p.i. [Std.]	Injektions- lösung	Gesamtorganaktivität [Imp/min]		AVF Leber	AVF Niere
		Leber	Niere		
1	$^{57}\text{Co-BLM}$	101 581	198 854	0,64	5,98
2		54 888	114 468	0,32	3,55
4		33 497	73 319	0,20	2,42
8		28 207	64 869	0,17	1,87
25		20 691	59 545	0,10	1,40
1	$^{57}\text{CoCl}_2$	747 471	497 856	6,55	20,35
2		573 328	364 357	3,68	14,66
4		485 376	239 360	3,54	9,32
8		495 018	154 717	3,61	5,85
25		505 123	127 575	2,90	5,13

Tabelle 6: Kinetik von $^{57}\text{Co}(\text{Cl}_2)$ und $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$

Die in Abb. 8 dargestellten Rententionskurven wurden graphisch in 2 Exponentialfunktionen zerlegt, die einen anfänglichen Bereich mit schneller und einen folgenden mit langsamer Ausscheidung beschreiben. Nach Abtrennen jeweils einer Phase ergeben sich zwei Halbwertszeiten $t_{1/2,I}$ und $t_{1/2,II}$ [19].

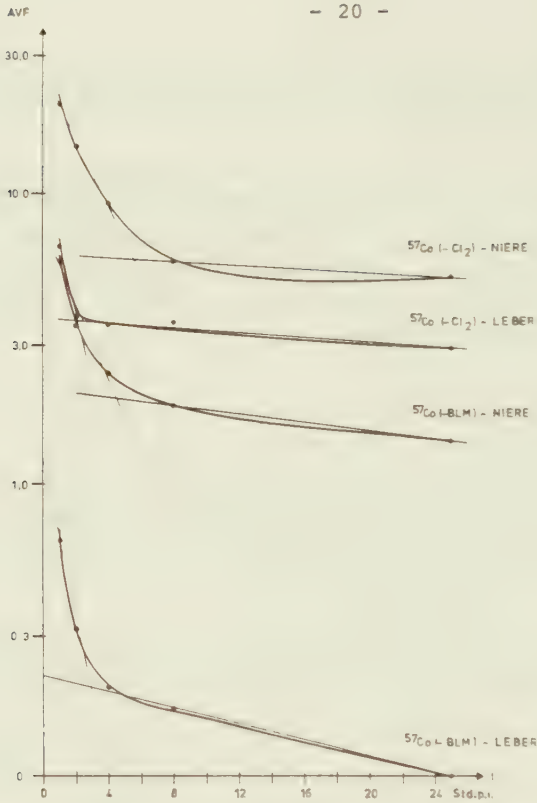


Abb. 8: Auf Injektionsmenge, Organgewicht und Körpergewicht normierte Organaktivitäten nach i.v. Injektion von $^{57}\text{CoCl}_2$ bzw. $^{57}\text{Co-BLM}$

$t_{1/2, I}$ [Std.]	$t_{1/2, II}$ [Std.]	Injektionslösung	Organ
0,55	91,7	$^{57}\text{CoCl}_2$	Leber
0,80	20,5	$^{57}\text{Co-BLM}$	Leber
1,45	87,4	$^{57}\text{CoCl}_2$	Niere
0,85	40,8	$^{57}\text{Co-BLM}$	Niere

Tabelle 7: Halbwertszeiten des Radiopharmakons nach Injektion von $^{57}\text{CoCl}_2$ und $^{57}\text{Co-BLM}$

C.II.2.2. KINETIK VON IMMUNREAKTIVEM BLM

Für den BLM-Nachweis wurde eine Standardbindungskurve unter Zusatz von BLM-freiem Organhomogenat aus einem Kontrolltier aufgenommen.

Ansatz: 100 μ l Tracer (s. S. 3)
 200 μ l Antiserum (s. S. 6)
 25 μ l Organhomogenat
 25 μ l BLM-Standard

Die Inkubationszeit betrug 2 Std. bei 37 °C.

Die Homogenate enthielten für die Aufnahme der Standardbindungskurve und für die Herstellung der Probenlösungen 0,20 g Lebergewebe/ml bzw. 0,10 g Nierengewebe/ml. Die Standardbindungskurven wurden für einen Bereich von $1,5 \cdot 10^{-7}$ g BLM/ml bis $2 \cdot 10^{-5}$ g BLM/ml aufgenommen. In der Leber konnte radioimmunologisch bereits 1 Std. nach Injektion kein BLM mehr nachgewiesen werden. In der Niere betrug die immunreaktive BLM-Konzentration $70 \cdot 10^{-6}$ g BLM pro g Nierengewebe 1 Std. p.i. und $5,2 \cdot 10^{-6}$ g BLM pro g Nierengewebe 2 Std. p.i.

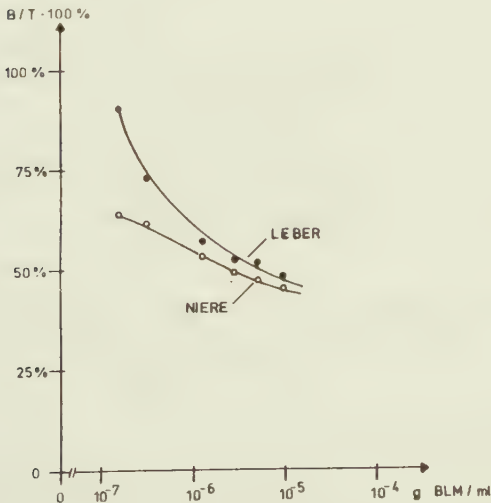


Abb. 9: BLM-RIA Standardkurve für Nieren- und Leberhomogenat

C.III. SPEICHERUNG VON ^{125}J -BLM, ^{57}Co -BLM UND $^{57}\text{CoCl}_2$ IN ORGAN-
HOMOGENATEN UND DEREN KERNFRAKTIONEN IN VIVO

Die Isolierung der Kernfraktionen und der Nachweis von ^{125}J (-BLM), ^{57}Co (-BLM) und $^{57}\text{Co}(\text{Cl}_2)$ in den Zellkernen begründet sich im wesentlichen durch folgende Überlegungen:

1. Eine Abtrennung der Zellkernfraktion sofort nach Organentnahme verhindert einen unkontrollierten weiteren Abbau des BLM durch zytoplasmatische Enzymsysteme während der Aufbereitung und Inkubation der Organhomogenate zur immunologischen BLM-Bestimmung.
2. Der Angriffsort für die biologische Wirksamkeit des BLM ist der Zellkern bzw. die Zellkernmembran [20]. Es erscheint somit sinnvoll, die aktuelle Konzentration des markierten BLM direkt im bzw. am Zellkern zu ermitteln und mit der Anreicherung von $^{57}\text{Co}(\text{Cl}_2)$ zu vergleichen.

C.III.1. VERSUCHSAUFBAU

1. Intravenöse Injektion von $100\ \mu\text{l}$ $^{57}\text{CoCl}_2$ bzw. ^{57}Co -BLM oder ^{125}J -BLM entsprechend einer Radioaktivität von $0,5\ \mu\text{Ci}$ und einer BLM-Menge von $5 \cdot 10^{-4}\ \text{g}$.
2. Tötung und Organentnahme nach jeweils gleichen Zeiten p.i.
3. Homogenisierung der Organe im TKM-Puffer, wie in Kap. B.II. beschrieben.
4. Ausmessen der Homogenataktivitäten.
5. Kernisolierung, wie in Kap. B.III. beschrieben.
6. Ausmessen der Kernaktivitäten.

Die Tötung und Organentnahme erfolgte bei allen Ratten zwischen 83 und 85 min p.i.

C.III.2. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse in Form des Aktivitätsverteilungsfaktors AVF (vgl. S. 18) sind in den Tab. 8 bis 11 wiedergegeben:

	Injektionslösung		
	$^{57}\text{CoCl}_2$	$^{57}\text{Co-BLM}$	$^{125}\text{J-BLM}$
Lungenhomogenat	0,63	0,44	0,19 ₆
Leberhomogenat	6,52	0,36	0,13 ₉
Nierenhomogenat	11,31	3,50	0,93 ₅

Tabelle 8: Homogenataktivitäten, angegeben als Aktivitätsverteilungsfaktor AVF

Aufschlußreich für den Vergleich der Speicherung von $^{57}\text{Co}(\text{Cl}_2)$ und $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ ist der Quotient der jeweiligen Aktivitätsverteilungsfaktoren:

	$\frac{\text{AVF } ^{57}\text{Co}(-\text{BLM})}{\text{AVF } ^{57}\text{Co}(\text{Cl}_2)}$
Lungenhomogenat	0,70
Leberhomogenat	0,05 ₆
Nierenhomogenat	0,31

Tabelle 9

Nach Injektion von $^{57}\text{Co-BLM}$ ist somit in den betrachteten Organen die Aktivitätsspeicherung schwächer als nach Injektion von $^{57}\text{CoCl}_2$.

Die Ergebnisse durch Ausmessen der Kernfraktionen sind in Tab. 10 gezeigt. Die Normierung entspricht der in Tab. 8, so daß die Ergebnisse direkt vergleichbar sind.

	Injektionslösung		
	$^{57}\text{CoCl}_2$	$^{57}\text{Co-BLM}$	$^{125}\text{J-BLM}$
Lungenkerne	0,01 ₇	0,29	0,20
Leberkerne	0,05 ₇	0,08	0,10
Nierenkerne	0,03 ₁	0,42	0,23

Tabelle 10: Kernaktivitäten, angegeben als Aktivitätsverteilungsfaktor AVF

Tab. 11 zeigt die differente Aktivitätsanreicherung als Quotienten der AVF für $^{57}\text{Co-BLM}$ und $^{57}\text{CoCl}_2$ der Kernfraktionen.

	$\frac{\text{AVF } ^{57}\text{Co (-BLM)}}{\text{AVF } ^{57}\text{Co (Cl}_2)}$
Lungenkerne	17,20
Leberkerne	1,42
Nierenkerne	13,51

Tabelle 11

$^{57}\text{Co(-BLM)}$ wird besonders durch die Lungenkerne und Nierenkerne stärker gebunden als $^{57}\text{Co(Cl}_2)$.

C.IV. BELADUNG DER ZELLKERNE IN VITRO

Eine weitere Versuchsreihe gibt Auskunft über die organabhängige Zellkernbeladung mit ^{57}Co (-BLM) und ^{125}J (-BLM) in vitro. Ein Teil der Organhomogenate von Ratten wurde vor der Zellkernisolierung mit dem markierten BLM inkubiert. Bei einem weiteren Teil wurden zunächst die Kerne isoliert und anschließend mit dem markierten BLM beladen.

Durch diesen Versuchsaufbau kann der Einfluß des zytoplasmatischen Abbaus des markierten BLM und der dadurch veränderten Bindung an den Zellkern untersucht werden.

C.IV.1. BELADUNG MIT ^{57}Co (-BLM)

Versuchsaufbau:

1. Homogenisierung von 0,8 g Organ (s. S. 12).
 2. Aufnahme des halben Homogenates in 10 ml TKM-Puffer zur Volumenvergrößerung.
 3. Versetzen dieser Lösung mit 32 μCi ^{57}Co -BLM entsprechend einer BLM-Menge von $5 \cdot 10^{-4}$ g.
 4. Inkubation bei Überkopfrotation für 2 Std. bei Zimmertemperatur.
 5. Isolierung der Kernfraktionen nach Inkubation.
 6. Ausmessen der Kernaktivitäten.
-
7. Isolierung der Kernfraktion aus der zweiten Hälfte des Ausgangshomogenates (s. Punkt 2)
 8. Inkubation der Kernfraktion mit 32 μCi ^{57}Co -BLM ($5 \cdot 10^{-4}$ g BLM)
 9. Abzentrifugieren und Waschen der beladenen Zellkerne.
 10. Ausmessen der Kernaktivitäten.

Das relative Speicherverhalten der untersuchten Organe (Bezugsgröße ist die Speicherung von ^{57}Co (-BLM) in der Leber) ist in Tab. 12 gezeigt.

	Leber	Niere	Lunge
rel. Speicherung von $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ der Kerne nach Inkubation			
- des Homogenates - s. Punkt 1 - 6	1	1,51	3,26
- der Kerne - s. Punkt 7 - 10	1	0,93	0,59

Tabelle 12: Relatives Speicherverhalten der Zellkerne in vitro nach Inkubation des Homogenates bzw. der Kernfraktion mit $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$

Die hohe Zytoplasmaaktivität des Leber- und Nierengewebes scheint gegenüber den Verhältnissen in der Lunge bei Inkubation des frischen Homogenates mit $^{57}\text{Co}-\text{BLM}$ eine stärkere Anreicherung von $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ im Zellkern zu verhindern.

C.IV.2. BELADUNG MIT $^{125}\text{J}(-\text{BLM})$

Der Versuchsaufbau entsprach dem in Kap. C.IV.1. Zur Beladung werden 5 μCi $^{125}\text{J}-\text{BLM}$ ($5 \cdot 10^{-4}$ g BLM) eingesetzt. Die relative Speicherung von $^{125}\text{J}(-\text{BLM})$ in den Zellkernen ist in Tab. 13 aufgeführt. Bezugsorgan ist wiederum die Leber.

	Leber	Niere	Lunge
rel. Speicherung von $^{125}\text{J}(-\text{BLM})$ der Kerne nach Inkubation			
- des Homogenates - s. Punkt 1 - 6 (S. 25)	1	0,71	0,88
- der Kerne - s. Punkt 7 - 10	1	1,41	1,45

Tabelle 13: Relatives Speicherverhalten der Zellkerne in vitro nach Inkubation des Homogenates bzw. der Kernfraktion mit $^{125}\text{J}(-\text{BLM})$

Zytoplasmatischer Abbau und Kernaффinität von $^{125}\text{J}(-\text{BLM})$ stehen in einem deutlichen Gegensatz zum Abbau und der Kernanlagerung von $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$.

C.V. KINETIK VON $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ IN LUNGENHOMOGENAT UND -ZELL-
KERNEN

Die zeitliche Radioaktivitätsabnahme im Gewebe und in den Zellkernen wurde am Beispiel der Lunge von Ratten untersucht.

Versuchsaufbau:

1. Jeder Versuchsratte wurden $25 \mu\text{Ci } ^{57}\text{Co-BLM}$ ($5 \cdot 10^{-4} \text{ g BLM}$) intravenös injiziert ($\text{NaCl } 0,9 \text{ \% ad } 100 \mu\text{l}$).
2. Tötung und Organentnahme 0,5; 1,4; 3,2 und 27 Std. p.i.
3. Homogenisierung der Organe (s. S. 12)
4. Ausmessen der Homogenataktivität
5. Isolierung der Kernfraktionen
6. Ausmessen der Kernfraktionen

Die Ergebnisse sind in Tab. 14 aufgeführt:

Zeit p.i. Std.	AVF _{Lungenhomogenat}	AVF _{Lungenkerne}	rel. Anreicherungs- quotient
0,5	1,48	0,78	0,52
1,4	0,44	0,29	0,65
3,2	0,12	0,08 ₇	0,72
27,0	0,07	0,05 ₉	0,84

Tabelle 14

Die Aktivität im Lungenzellkern steigt von 52 % der Homogenataktivität 0,5 Std. p.i. auf 84 % 27 Std. p.i. an.

Es zeigt sich damit in der Lunge eine erhöhte Affinität von $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ zum Zellkern gegenüber dem Homogenat.

C.VI. RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON BLM IM ZELLKERN

Versuchsaufbau:

1. Injektion von $5 \cdot 10^{-4}$ g BLM (100 μ l) in die Schwanzvene
2. Tötung der Versuchsratten und Organentnahme 85 min p.i.
3. Homogenisierung (Ausgangsmenge: 0,8 g Organ, Verfahren s. S. 12)
4. Isolierung der Zellkerne (Verfahren s. S. 13)
5. Aufnahme einer BLM-Assay-Standardkurve:
Ansatz: 100 μ l Tracer (s. S. 3)
 200 μ l Antiserum 1 : 150 (s. S. 5)
 25 μ l BLM-Standardlösung
6. Bestimmung der BLM-Konzentration in 100 μ l Kernemulsion mit Verdünnungsgrad 1 (s. S. 13)

eingesetzte Kernemulsion	B/T
Lungenkerne	$0,50 \pm 0,01^{(*)}$
Leberkerne	$0,52 \pm 0,00_2$
Nierenkerne	$0,66 \pm 0,03$

Tabelle 15

(*) aus je 3 Versuchsreihen

Die Nierenkerne liefern einen Wert B/T, der den initialen Bindungswert der Standardkurve B_0/T von 0,56 übersteigt. Der radioimmunologische Nachweis von BLM im Zellkern erscheint damit durch dieses Verfahren nicht aussichtsreich.

C.VII. AUFBAU EINES KERNREZEPTOR-ASSAYS

C.VII.1. ALLGEMEINE VORAUSSETZUNGEN

Die hohe Affinität von BLM zum Zellkern (s. Kap. C.III., C.IV., C.V. und C.VI.) bietet prinzipiell die Möglichkeit, einen Kernrezeptor-Assay für den BLM-Nachweis aufzubauen. Die Funktionstüchtigkeit eines solchen Assays ist an folgenden Voraussetzungen gebunden:

1. Bereitstellung definierter Kernrezeptormengen
2. Definierte Oberflächenverhältnisse der Kernmembranen
3. Stabilität des Kernrezeptors bezüglich Lagerfähigkeit und Inkubation
4. Reproduzierbarkeit der Standardkurven
5. Spezifität der Kernrezeptor-BLM-Bindung

Die Punkte 1 - 4 beinhalten experimentelle Probleme, Punkt 5 ist Grundvoraussetzung für den Aufbau eines solchen Systems.

C.VII.2. KERNBELADUNGSKAPAZITÄT FÜR ^{57}Co (-BLM)

C.VII.2.1. ABHÄNGIGKEIT VON DER VERDÜNNUNG DER KERNEMULSION

Versuchsaufbau:

1. Isolierung von Lungenzellkernen (s. S. 13)
2. Suspension der Kerne in TKM-Puffer unter Triton X-Zusatz als Emulgator in ansteigenden Puffermengen. (Einstellung der Verdünnungsgrade 1, 5, 20 und 100, s. S. 13)
Durch den Triton X-Zusatz (ca. 1 Vol%) war eine Ausflockung der Emulsion nicht erkennbar.
3. Inkubation von je 100 μl Kernemulsion bei Überkopfrotation und Zimmertemperatur für 2 Std. mit 1 μCi

⁵⁷Co-BLM entsprechend einer BLM-Menge von $5 \cdot 10^{-8}$ g BLM unter Zusatz von 1 ml TKM-Puffer zur Volumen-
erhöhung

4. Abzentrifugieren und Waschen der beladenen Kerne
(mit TKM-Puffer)
5. Ausmessen der Kernaktivitäten im automatischen
Gammazähler

Die Ergebnisse sind in Tab. 16 und in Abb. 10 gezeigt:

Verdünnungsgrad f	1	5	20	100
Kerngebundene Aktivität in Prozent der eingesetzten Aktivität	29,6	10,8	8,2	7,1
rel. Kernbeladungskapazität $KB = \frac{B(f)}{B(f=1)} \cdot f$	1	1,82	5,54	23,99

Tabelle 16

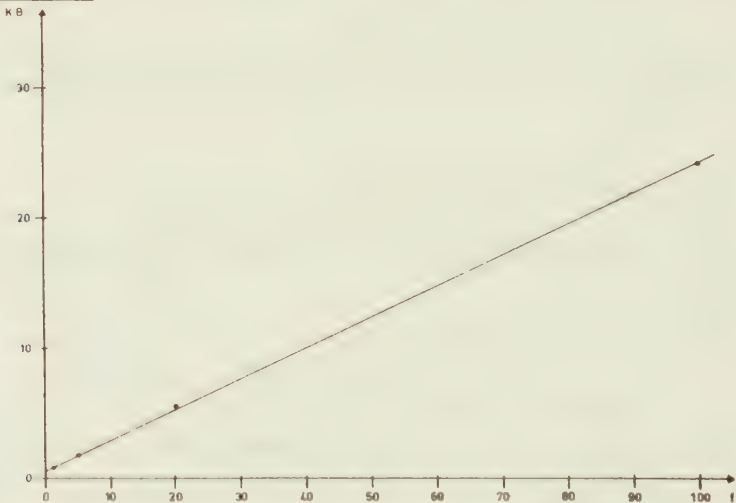


Abb. 10: rel. Kernbeladungskapazität $KB = \frac{B(f)}{B(f=1)} \cdot f$ von
Lungenkernen in Abhängigkeit vom
Verdünnungsgrad der Kernemulsion

Es resultiert eine lineare Abhängigkeit der Kernbeladungs-
kapazität KB vom Verdünnungsgrad f.

C.VII.2.2. ABHÄNGIGKEIT VON DER KONZENTRATION DER ^{57}Co -BLM-LÖSUNG

Zur Ermittlung der Abhängigkeit der Kernbeladung von der Konzentration der ^{57}Co -BLM-Lösung wurden in einem weiteren Versuch zusammen inkubiert:

500 μl Lungenkernemulsion (Verdünnungsgrad 1)

je 100 μl ^{57}Co -BLM-Lösung (entsprechend 10^{-9} g BLM/ml;
 $6,5 \cdot 10^{-3}$ μCi ^{57}Co /ml
bis 10^{-5} g BLM/ml;
65 μCi ^{57}Co /ml)

1 ml TKM Puffer

Inkubation: 2 Std. bei Überkopfrotation und Zimmertemperatur.
Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

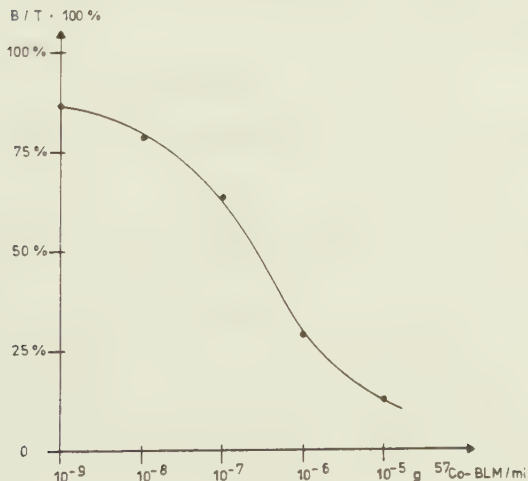


Abb. 11: Abhängigkeit der Lungenkernbeladung von der ^{57}Co -BLM-Konzentration

Abb. 11 läßt erkennen, daß mit einer ausreichenden Bindung von markiertem BLM durch die Kernemulsion bei folgendem Ansatz zu rechnen ist (vgl. Abb. 1):

500 µl Kernemulsion - Verdünnungsgrad 1
100 µl Tracer (entsprechend 10^{-7} g BLM/ml)
und 1 ml TKM-Puffer.

C.VII.2.3. AUFNAHME VON STANDARDKURVEN

Die Abb. 12 zeigt die Aufnahme von Kernrezeptor-Assay-Standardkurven für Kernfraktionen von Lungen-, Leber- und Nierengewebe aus Ratten. Zum Vergleich wurde eine Bindungskurve bei Einsatz von Mäusenieren aufgenommen. Die Kernisolierung wurde wie auf S. 13 beschrieben durchgeführt.

Assayansatz:

100 µl ^{57}Co -BLM-Tracer (10^{-7} g BLM/ml)
100 µl BLM-Standard
500 µl Kernemulsion - Verdünnungsgrad 1
und 1 ml TKM-Puffer

Inkubation: 2 Std. Überkoprotation bei Zimmertemperatur

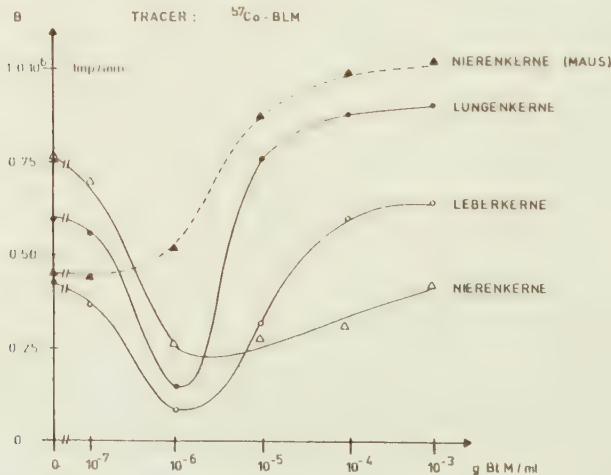


Abb. 12: Kernassay-Standardkurven für Lungen-, Leber- und Nierenkerne

Ab BLM-Konzentrationen von etwa 10^{-6} g/ml zeigt sich für die aus Ratten isolierten Zellkerne ein deutlicher paradoxer Bindungsanstieg. Auch die aus Mäusen gewonnenen Nierenkerne zeigten ein ähnliches Verhalten, jedoch setzte hier der Effekt schon bei niedrigeren BLM-Konzentrationen ein.

Abb. 13 zeigt die Aufnahme der Kernrezeptor-Assay-Bindungskurve unter Einsatz von ^{125}J -markierten Tracer (ca. 5%-ige Markierung). Hier zeigte sich über 3 Zehnerpotenzen ein annähernd linearer Abfall der gebundenen Aktivität mit ansteigender BLM-Standard-Konzentration.

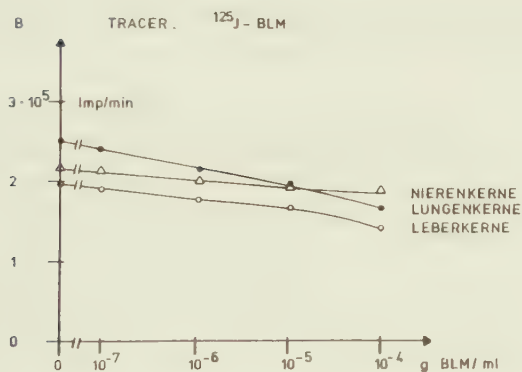


Abb. 13: Kernassay-Standardkurve
Tracer: ^{125}J -BLM, 10^{-7} g BLM/ml

Der Aufbau eines Kernrezeptor-Assays erscheint somit prinzipiell möglich. Eine stärkere Konzentrationsabhängigkeit der gebundenen Aktivität war auch durch mehrfache Variation der Volumenverhältnisse noch nicht erreichbar. Weitere Versuche, die die Alterung der Zellkerne und die Bereitstellung von Emulsionen mit definierten Oberflächenverhältnissen untersuchen, sind geplant.

D. THEORETISCHER TEIL

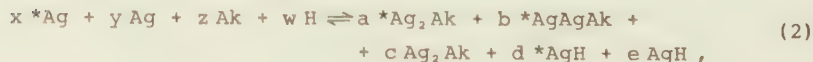
D.I. MODELLRECHNUNG ZUM RADIOIMMUNASSAY ZUR BLM-MESSUNG IN HOMOGENATEN

Die entwickelte Modellrechnung gestattet einen Vergleich der in Kap. C.1. gezeigten Bindungskurven für gleichzeitige Homogenat- und Antikörperbindung mit den der Rechnung zugrundegelegten Postulaten. Weiterhin wurde durch Linearisierung der Standardkurven aus Abb. 2 der BLM-Standardbereich ermittelt, bei dem ein ideales kompetitives Bindungsverhalten vorliegt.

D.I.1. POSTULAT I: 2-BINDIGER ANTIKÖRPER - STARKE ANTIGEN- ANTI-KÖRPERBINDUNG

Die Modellrechnung postuliert hier einen zweiwertigen Bleomycinantikörper, d.h. einen Antikörper der immunologischen Klassifizierung IgG [11,12], in Konkurrenz mit jeweils einbindigen Homogenateinheiten, wobei jedoch die freien Antikörper homogenatgebundenes Antigen aus deren Bindung verdrängen.

Die allgemeinen Reaktionsbedingungen lassen sich durch folgendes Gleichgewicht ausdrücken:



wobei: $x \cdot \text{Ag}$ die x -fache Menge des markierten Antigens (BLM) darstellt,

$y \cdot \text{Ag}$ die y -fache Menge des unmarkierten Antigens,

$z \cdot \text{Ak}$ die z -fache Menge des eingesetzten Antikörpers,

$w \cdot \text{H}$ die w -fache Menge der eingesetzten Homogenateinheiten,

$a \cdot \text{Ag}_2\text{Ak}$ die a -fache Menge des durch Antikörper abgesättigten vollständig markierten Antigenkomplexes,

b *AgAgAk die b-fache Menge des durch Antikörper abgesättigten halbmarkierten Antigenkomplexes,
c Ag₂Ak die c-fache Menge des durch Antikörper abgesättigten unmarkierten Antigenkomplexes,
d *AgH die d-fache Menge des mit markiertem Antigen abgesättigten Homogenatkomplexes
und e AgH die mit unmarkiertem Antigen abgesättigte e-fache Menge des Homogenatkomplexes,
in jeweiligen Teilchenzahlrelationen.

Die durch Komplexbildung gebundene Aktivität B_I errechnet sich damit zu:

$$B_I = 2a + b + d . \quad (3)$$

(Die Indizierung gibt das zur Berechnung der gebundenen Aktivität zugrunde gelegte Postulat an.)

Die gebundene unmarkierte Antigenmenge U wird durch Summation folgender Koeffizienten ermittelt:

$$U_I = b + 2c + e .$$

x beschreibt die eingesetzte Aktivität in Form der markierten Antigenmenge und y die Menge der unmarkierten Antigene (inklusive der zur Reaktion eingesetzten Standardlösungen).

Das Verhältnis der gebundenen markierten Antigenmenge zur unmarkierten Antigenmenge ist somit:

$$\frac{x}{y} = \frac{2a + b + d}{b + 2c + e} . \quad (4)$$

Für $y = 0$, d.h. für den hypothetischen Fall, daß nur vollständig markierte Antigene eingesetzt werden, ergibt sich unter den Bedingungen des oben postulierten 1. Falls, daß die Antigen-Antikörperbindung gegenüber der Antigen-Homogenatbindung überwiegt und somit noch freie Antikörper Bleomycin aus Homogenatbindungen entreißt:

$$z_I = a \quad \text{und} \quad w_I = d \quad (5)$$

unter der Voraussetzung, daß

$$x/2 \geq z_I \quad \text{und} \quad x \geq w_I \quad (6)$$

bzw. für den allgemeinen Fall:

$$x/2 + y \geq z_I \quad \text{und} \quad x + y \geq d + e . \quad (7)$$

Somit wird garantiert, daß die eingesetzte Antigenmenge die gesamte Antikörper- bzw. Homogenatmenge komplexieren kann.

Unter der postulierten Bedingung, daß die Antikörper Bleomycin aus der Homogenatbindung drängen sollen, folgt aus Gl. (6):

$$z_I = f_0 \cdot \frac{x}{2} \quad (8)$$

für den Fall eines zweibindigen Antikörpers, und mit f_0 der Verhältniszahl der Mengenanteile von z_I und $\frac{x}{2}$.

(Der Index 0 symbolisiert, daß nur vollständig markierte Antigene vorliegen, d.h. $y = 0$.)

Weiterhin ergibt sich aus Gl. (6) und der Voraussetzung einer vollständig überwiegenden Antigen-Antikörperbindung:

$$w_I = v_0 \left(x - f_0 \cdot \frac{x}{2} \right) . \quad (9)$$

v_0 stellt das Verhältnis der noch verbleibenden markierten Antigenmenge zur eingesetzten Homogenatmenge dar.

Für f_0 und v_0 gilt somit:

$$0 \leq f_0, v_0 \leq 1 . \quad (10)$$

Für den allgemeinen Fall mit unmarkierten Antigenmengen ($y \neq 0$) gilt entsprechend:

$$z_I = a + b + c = \frac{x}{2} f_0 \quad (11)$$

$$\text{und} \quad w_I = d + e = \left(x - f_0 \frac{x}{2} \right) v_0 \quad (12)$$

$$\text{bzw.} \quad c = \frac{x}{2} f_0 - a - b \quad (13)$$

$$\text{und} \quad e = v_0 \left(x - f_0 \frac{x}{2} \right) - d. \quad (14)$$

Aus den Gleichungen (4), (13) und (14) folgt:

$$\frac{2a + b + d}{x} = \frac{x f_0 + x v_0 - v_0 f_0 \frac{x}{2} - (2a + b + d)}{y} \quad (15)$$

bzw. mit Gleichung (3):

$$B_I = \frac{f_0 x^2 + v_0 x^2 - v_0 f_0 \frac{x^2}{2}}{x + y}. \quad (16)$$

D.I.2. POSTULAT II: 2-BINDIGER ANTIKÖRPER - STARKE HOMOGENAT- ANTIGENBINDUNG

Für das POSTULAT II, daß zunächst alle Homogenatvalenzen gegenüber den schwächer bindenden Antikörpervalenzen abgesättigt werden, gilt nach analoger Betrachtungsweise:

$$w_{II} = v_0 \cdot x \quad (17)$$

$$\text{und} \quad z_{II} = f_0 \cdot \frac{1}{2} (x - v_0 \cdot x). \quad (18)$$

Allgemein gilt wiederum:

$$z_{II} = a + b + c = f_0 \frac{1}{2} (x - v_0 x) \quad (19)$$

$$\text{bzw.} \quad c = f_0 \frac{1}{2} (x - v_0 x) - a - b \quad (20)$$

$$\text{und} \quad w_{II} = d + e = v_0 x \quad (21)$$

$$\text{oder} \quad e = v_0 x - d . \quad (22)$$

Mit Gleichung (4) ergibt sich für das II. Postulat:

$$B_{II} = \frac{f_0 x^2 + v_0 x^2 - f_0 v_0 x^2}{x + y} . \quad (23)$$

Gleichung (16) und (23) unterscheiden sich somit lediglich im subtraktiven Glied um den Faktor 2.

Für $w = 0$, d.h. für die Berechnung der Kontrollkurve in den Figuren 4 und 5 (keine Zugabe von Homogenatlösungen zum RIA-Ansatz) ergibt die analoge Berechnung für die gebundene Aktivität $B_{\text{Kontrolle}}$:

$$B_{\text{Kontrolle}} = \frac{f_0 x^2}{x + y} \quad (24)$$

bzw. für $z = 0$, d.h. für die Berechnung der Bleomycin-Standard-abhängigen homogenatgebundenen Aktivität (experimentelle Kurven in Abb. 6 und 7) bei Fehlen von Antikörpern:

$$B_{\text{Homogenat}} = \frac{v_0 x^2}{x + y} . \quad (25)$$

Gleichung (24) ist nicht von der postulierten Wertigkeit der eingesetzten Antikörper abhängig!

Gleichung (16) läßt sich überführen in:

$$B_I = B_{\text{Kontrolle}} + B_{\text{Homogenat}} - \frac{1}{2} f_0 B_{\text{Homogenat}} , \quad (26)$$

ebenso ergibt sich für Gleichung (23):

$$B_{II} = B_{\text{Kontrolle}} + B_{\text{Homogenat}} - f_0 B_{\text{Homogenat}} . \quad (27)$$

f_0 und v_0 beschreiben den durch die Antikörper bzw. durch das Homogenatgebundenen Anteil der eingesetzten Gesamtaktivität x für $y = 0$, d.h. für den Fall, daß kein unmarkiertes Bleomycin als Bindungskonkurrent eingesetzt wird.

D.I.3. POSTULAT III: 5-BINDIGER ANTIKÖRPER - STARKE ANTIGEN-
ANTIKÖRPERBINDUNG

Fordert man in einem III. POSTULAT das Vorliegen 5-wertiger (IgM-Gruppe [11,12]) gegen Bleomycin gerichtete Serumantikörper, so muß Gleichung (2) entsprechend abgewandelt werden:

$$\begin{aligned} x \cdot Ag + y \cdot Ag + z \cdot Ak + w \cdot H &\rightleftharpoons a \cdot Ag_5 Ak + b \cdot Ag_4 Ag Ak \\ &+ c \cdot Ag_3 Ag_2 Ak + d \cdot Ag_2 Ag_3 Ak \\ &+ e \cdot Ag Ag_4 Ak + f \cdot Ag_5 Ak \\ &+ g \cdot Ag H + h \cdot Ag H . \end{aligned} \quad (28)$$

In Analogie zu Gleichung (3) läßt sich für die Antikörper- bzw. Homogenat-gebundene Aktivität formulieren:

$$B_{III} = 5a + 4b + 3c + 2d + e + g \quad (29)$$

bzw. für die gebundene unmarkierte Antigenmenge:

$$U_{III} = b + 2c + 3d + 4e + 5f + h . \quad (30)$$

Für z_{III} und w_{III} ergibt sich allgemein:

$$\begin{aligned} z_{III} &= a + b + c + d + e + f , \\ w_{III} &= g + h . \end{aligned} \quad (31)$$

Der Index III beschreibt folgende Vereinbarung:

- 1: Die Antikörper entreißen Bleomycin aus bestehenden Homogenatbindungen.
- 2: Die Antikörper sind 5-wertig (gehören also zur Gruppe der IgM-Globuline).

Es gilt wiederum die Voraussetzung, daß die eingesetzte Antikörpermenge bzw. die Homogenatmenge die gesamte Antigenmenge binden kann.

Für den Fall $y = 0$ gilt:

$$z_{III} = a = f_0 \frac{x}{5} \quad (32)$$

$$\text{und } w_{III} = g = v_0 \left(x - f_0 \frac{x}{5} \right). \quad (33)$$

Der weitere Rechengang erfolgt analog zur Berechnung der Assaykurve unter der Voraussetzung eines 2-bindigen Antikörpers und ergibt:

$$B_{III} = \frac{f_0 x^2 + v_0 x^2 - v_0 f_0 \frac{x^2}{5}}{x + y} \quad (34)$$

bzw. mit den Gleichungen (24) und (25):

$$B_{III} = B_{\text{Kontrolle}} + B_{\text{Homogenat}} - \frac{1}{5} f_0 \cdot B_{\text{Homogenat}}. \quad (35)$$

D.I.4. POSTULAT IV: 5-BINDIGER ANTIKÖRPER - STARKE HOMOGENAT-ANTIGENBINDUNG

Unter der Voraussetzung, daß zunächst alle Homogenatvalenzen abgesättigt werden und das Homogenat Bleomycin aus eingegangener Antikörperbindung entreißt (POSTULAT IV), folgt:

$$w_{IV} = v_0 x = g + h \quad (36)$$

$$\text{und } z_{IV} = f_0 \frac{1}{5} (x - v_0 x) = a + b + c + d + e + f. \quad (37)$$

Damit ergibt sich für die gebundene Aktivität B_{IV} :

$$B_{IV} = \frac{f_0 x^2 + v_0 x^2 - f_0 v_0 x^2}{x + y} \quad (38)$$

$$\text{oder } B_{IV} = B_{\text{Kontrolle}} + B_{\text{Homogenat}} - f_0 \cdot B_{\text{Homogenat}} \quad (39)$$

Bei Definition einer gegenüber der Homogenatbindung schwachen Antikörperbindung ergibt sich eine Übereinstimmung von Gleichung (39) mit Gleichung (27), da in beiden Fällen zunächst die Homogenatvalenzen abgesättigt werden, und nur die ver-

bleibenden Antigenmengen von den noch freien Antikörpern unter Ausschöpfung deren totaler Bindungskapazität komplexiert werden. Die Bindigkeit des einzelnen Antikörpers spielt hier erwartungsgemäß keine Rolle.

Dominiert jedoch die Antikörperbindung über die Homogenatbindung, so erfolgt zunächst eine Absättigung aller Antikörper mit je 5 Antigenen. Die resultierende gebundene Aktivität wird gegenüber dem Fall mit postulierten 2-bindigen Antikörpern und in noch stärkerem Maße gegenüber dem Fall mit postulierten dominierenden Homogenatbindungen erhöht sein. Diese Überlegungen werden durch Vergleich der Gleichungen (35), (26) und (27) bzw. (39) bestätigt.

Die experimentelle Aufnahme der Kurven in den Abb. 3 bis 6 erfolgte mit einem Tracer, der pro 100 μl Ansatzvolumen eine Bleomycinmenge von $5 \cdot 10^{-10}$ g enthielt. Dieser Menge entsprach eine Aktivität von 10^{-2} μCi bzw. ein Markierungsgrad von etwa 5 %. In der soeben beschriebenen Modellrechnung müßte also die Größe y , die die Standardbleomycinmenge beschreibt, durch die Summe $y + y'$ (mit y' der unmarkierten Bleomycinmenge des Tracers) ersetzt werden. Bei einer Zugabe von 25 μl der jeweiligen Standardlösungen im Konzentrationsbereich von $3,37 \cdot 10^{-7}$ g/ml bis 10^{-4} g/ml beträgt der Fehler bei Vernachlässigung der Größe y' 5,4 % bis 0,02 % und ist somit in guter Näherung zu vernachlässigen.

Konzentration der eingesetzten Standardlösung	Eingesetzte Bleomycinmenge (25 μl Standard)	unmarkierter BLM-Gehalt des Tracers (100 μl)	Fehler bei Vernachlässigung von y'
$3,37 \cdot 10^{-7}$ g BLM/ml	$8,43 \cdot 10^{-9}$ g BLM	$0,485 \cdot 10^{-9}$ g BLM	5,4 %
$1000 \cdot 10^{-7}$ g BLM/ml	$2500,00 \cdot 10^{-9}$ g BLM	$0,485 \cdot 10^{-9}$ g BLM	0,02 %

Tabelle 17

Vernachlässigt man diesen Fehler, so ist f_0 direkt aus den Kontrollkurven (Abb. 1 - 6) für eine BLM-Standardkonzentration von 0 abzulesen und ergibt:

$$f_0 = 0,55 .$$

D.I.5. KALKULATION DER BINDUNGSKURVEN FÜR KOMBINIERTE ANTIGEN-ANTIKÖRPER- UND ANTIGEN-HOMOGENAT-BINDUNG AUS DEN EINZELBINDUNGEN

Die Kalkulation erfolgt nach den oben hergeleiteten Beziehungen für die aufgeführten Postulate (Gleichungen (26), (27) und (35)).

Die Abb. 14 und 15 zeigen die Konstruktionen der Assaykurven für den Fall einer gleichzeitigen Zugabe von Serumantikörpern und Leber- bzw. Nierenhomogenat zum Assayansatz aus den entsprechenden einzelnen Kurven aus den Abb. 6 und 7. Diese theoretischen Bindungskurven können mit den experimentell ermittelten Kurven aus den Abb. 4 und 5 verglichen werden (s. Kap. C.1.).

Die Kalkulation von B_I , $B_{II}(B_{IV})$ und B_{III} für Leberhomogenatzusatz erfolgt aus den gemessenen Kurven $B_{Kontrolle}$ und $B_{Leberhomogenat}$ (Abb. 6) für Homogenatlösungen mit einem Proteingehalt von 10,63 g/ml:

BLM-Standard	$B_{Kontroll.}$	$B_{Homog.}$	B_{II}, B_{IV}	B_I	B_{III}	$B_{Leberhomog./ + Serum (Abb.4)}$
gemessen - Abb. 6			kalkuliert			gemessen
0	55,0 %	24,2 %	65,9 %	77,5 %	76,5 %	74,0 %
$3,3 \cdot 10^{-7}$ g/ml	40,9 %	23,6 %	51,6 %	58,1 %	62,0 %	60,3 %
16,9	34,5 %	20,6 %	43,8 %	49,4 %	52,8 %	48,3 %
67,5	30,3 %	14,7 %	36,9 %	40,9 %	43,4 %	42,0 %
1000,0	27,9 %	8,3 %	31,6 %	33,9 %	35,3 %	36,0 %

Tabelle 18: (Leberhomogenat), s. Abb. 14

In Tab. 18 und 19 wurden die angegebenen B-Werte in Prozent der eingesetzten Traceraktivität T angegeben.

BLM-Standard	B _{Kontr.}	B _{Homog.}	B _{II} , B _{IV}	B _I	B _{III}	B _{Nierenhomog./} + Serum (Abb.3)
gemessen - Abb. 5			kalkuliert			gemessen
0	55,0 %	26,0 %	66,7 %	73,9 %	78,1 %	72,2 %
$3,3 \cdot 10^{-7}$ g/ml	40,9 %	25,8 %	52,6 %	59,7 %	64,0 %	60,5 %
16,9	34,5 %	21,7 %	44,3 %	50,2 %	53,8 %	50,4 %
67,5	30,3 %	20,6 %	39,6 %	45,2 %	48,6 %	46,3 %
1000,0	27,9 %	19,9 %	36,9 %	42,3 %	45,6 %	40,6 %

Tabelle 19: Nierenhomogenat: 11,36 g Protein/l

Die Ergebnisse von Tab. 19 sind in Abb. 15 dargestellt; die Kalkulation der Kurven B_I, B_{II}(B_{IV}) und B_{III} erfolgte analog zu den Leberhomogenatberechnungen.

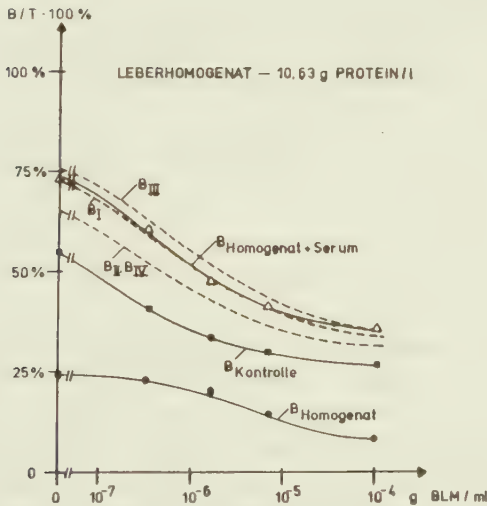


Abb. 14: Kalkulierte Standardbindungskurve für kombinierte Antigen-Antikörper- und Antigen-Homogenatbindung

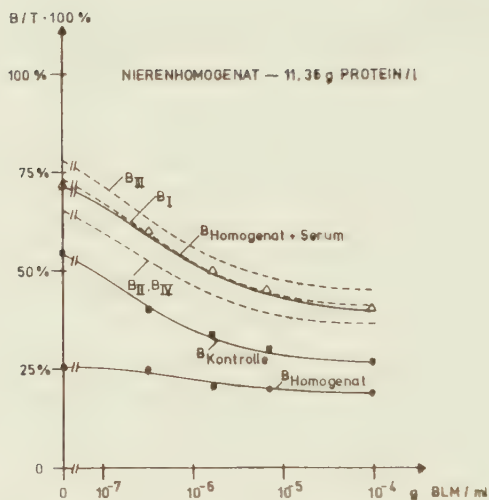


Abb. 15: Kalkulierte Standard-Bindungskurven B_I, B_{II}(B_{IV}) und B_{III} für kombinierte Antigen-Antikörper und Antigen-Homogenat-Bindung aus der reinen Homogenat- und Antikörperbindungskurve. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung der experimentellen Kurve (aus Abb. 4) mit der kalkulierten Kurve B_I (2-bindiger Antikörper - Überwiegen der Antikörperbindung gegenüber der Homogenatbindung).

Abb. 14 und 15 zeigen, daß sich die beiden experimentellen Assay-Kurven für die Ansätze:

100 µl Tracer
200 µl Serum (1 : 150)
25 µl BLM-Standard

und 25 µl Nierenhomogenat $\approx$ 11,36 g Protein/l
bzw. 25 µl Leberhomogenat $\approx$ 10,63 g Protein/l

in guter Übereinstimmung durch die jeweils kalkulierten Kurven approximieren lassen. Dieses Ergebnis legt für die Aufnahme einer Standardkurve unter jeweiliger Beimischung des entsprechenden Nieren- bzw. Leberhomogenates folgende Aussage nahe:

1. Die Affinität des Bleomycins (bzw. ^{57}Co -BLM) zum spezifischen Kaninchen serumantikörper ist größer als die zum Nieren- oder Leberhomogenat, bzw. der Antikörper verdrängt entsprechend POSTULAT I das Bleomycin aus seiner Homogenatbindung.
2. Die Kaninchenantikörper gegen Bleomycin-HSA-Konjugat gehören in ihrer Mehrzahl der immunologischen Gruppe IgG an, d.h. die Antikörper sind 2-bindig.

Weiterhin ist auffällig, daß die Bindungskurven für die Nierenhomogenate insgesamt flacher verlaufen als die für die Leberhomogenate. Dieses Ergebnis deutet auf eine höhere Bleomycinbindungskapazität des Nierenhomogenats gegenüber dem Leberhomogenat hin.

D.II. LINEARISIERUNG DER BINDUNGSKURVE

D.II.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Gleichung (24) stellt die Grundlage für Linearisierungsverfahren der Assaykurve dar:

$$B_{\text{Kontrolle}} = \frac{f_0 x^2}{x + y} \quad (24)$$

Die Auftragung von B über $\frac{1}{x+y}$ liefert eine Gerade mit der Steigung $f_0 x^2$, die durch den Ursprung geht. Die unspezifische Bindung wurde in der oben entwickelten Modellrechnung nicht berücksichtigt.

Die 1969 von Rodbard [29] vorgeschlagene Bindungsfunktion für ideal verdünnte Reaktionsgemische läßt sich in Gleichung (24) überführen. Die dort vorgeschlagene Linearisierung durch Logit-log-Transformation bietet keine Vorteile gegenüber der hier angewendeten Auftragung.

D.II.2. EXPERIMENTELLE ÜBERPRÜFUNG

In Abb. 16 sind die BLM-Standardkurven aus Abb. 2 für verschiedene Antiserumverdünnungen in linearisierter Form aufgetragen.

Um den BLM-Standardbereich über 4 Zehnerpotenzen darstellen zu können, wurde eine doppelt logarithmische Auftragung gewählt. Für eine Antiserumverdünnung von 1 : 150 zeigt sich der größte Bereich mit einer linearen Abhängigkeit der gebundenen Aktivität von der reziproken BLM-Konzentration ($1,3 \cdot 10^{-5}$ bis $2,1 \cdot 10^{-7}$ g BLM/ml).

Diese Antiserumverdünnung führt, wie auf S. 5 beschrieben, zu einer initialen Bindung von etwa 70 % der Traceraktivität.

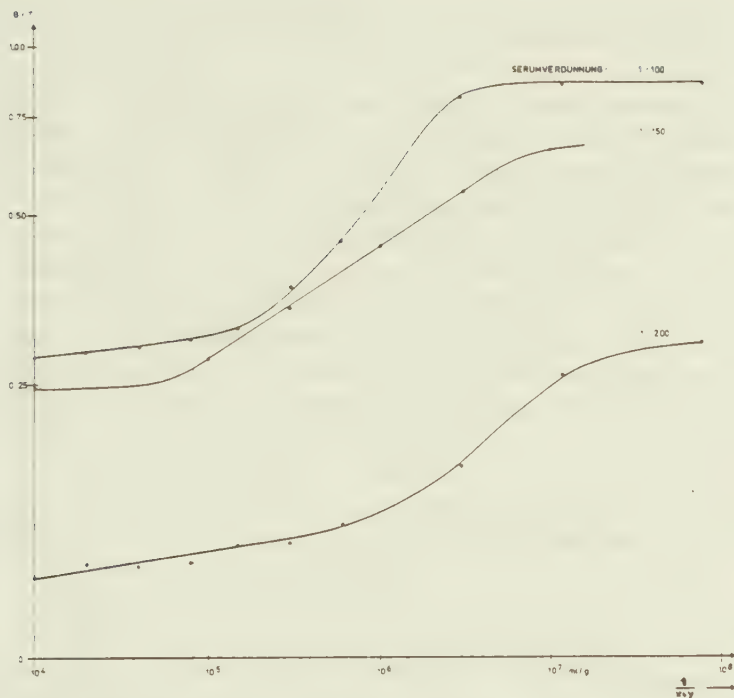


Abb. 16: BLM-Standardkurven. Linearisiert durch Auftragung von $\ln \frac{B}{T}$ über $\ln \frac{1}{x+y}$ mit $x = [^{57}\text{Co-BLM}]$ und $y = [\text{BLM}]$ in relativen Einheiten (s. S. 34)

Bei hohen und niedrigen BLM-Standardkonzentrationen ist eine Linearisierung nach diesem Verfahren nicht zu erreichen. Die idealisierten Bedingungen der entwickelten Modellrechnung berücksichtigen keine unspezifische Bindung und gelten auch nicht für ein Antikörperüberangebot. Hervorzuheben ist, daß diese idealisierten Voraussetzungen bei einer Serumverdünnung von 1:150 weitgehend verifiziert waren. Diese Verdünnung wurde schon in Kap. B.I.3. favorisiert, so daß die Linearität als Qualitätskriterium herangezogen werden kann.

E. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

=====

In der Literatur sind mehrfach Organverteilungsstudien nach Injektion von Radio-BLM anzutreffen. Besonders cheliertes BLM findet bei einer Reihe von Autoren wegen seiner einfachen Herstellung zur Messung der Aktivitätsverteilung von BLM Verwendung [2], [3], [4], [15], [33], [37], [38]. Die Organverteilung der Radioaktivität ist mit der von BLM nur bis zur enzymatischen Dissoziation der Chelatkomplexe korreliert. In den zitierten Arbeiten erfolgten die Aktivitätsmessungen in einem Zeitraum von 1 bis 72 Std. p.i. Hier kann die Stabilität des injizierten markierten BLM nicht vorausgesetzt werden.

Thema der vorliegenden Arbeit waren methodische Untersuchungen zur BLM-Bestimmung in Organen.

Als erste Meßmethode wurde ein RADIOIMMUNASSAY aufgebaut, der sich für den BLM-Nachweis im Serum als zufriedenstellend erwies (Kap. B.I.5). Die erreichte Empfindlichkeit betrug etwa $5 \cdot 10^{-8}$ g BLM/ml bzw. 1,25 ng und ist damit etwas höher als die von Elson et al. [11] publizierte. Der Zusatz von ORGANHOMOGENATEN zum RIA-Ansatz lieferte eine neben den Serumantikörpern zusätzliche Bindungskapazität für BLM. Nach alleiniger Inkubation von Homogenat, Tracer und BLM-Standard konnte eine unterschiedliche Bindung durch die Leber- und Nierenhomogenate nicht sicher beurteilt werden.

Die entwickelte MODELLRECHNUNG (Kap. D.I.) ergab durch Vergleich mit den experimentell ermittelten Bindungswerten, daß in dem aufgebauten Radioimmunassay die Bindung zwischen BLM und den spezifischen Antikörpern stärker ist als die zwischen BLM und dem Nieren- bzw. Leberhomogenat, und daß weiterhin in der Mehrzahl Antikörper der Gruppe IgG durch das beschriebene Immunisierungsverfahren gebildet werden.

Das auf Grundlage der Modellrechnung vorgeschlagene LINEARISIERUNGSVERFAHREN zeigte, daß die idealisierten Postulate der Modellrechnung bei der experimentellen Überprüfung am besten mit einer Antiserumverdünnung von 1 : 150 korrelieren (Abb. 16). Diese Verdünnung wurde bereits aufgrund experimenteller Erfahrungen favorisiert, so daß die Linearität der Bindungskurve bei Auftragung von $\ln B$ über $\ln \frac{1}{x+y}$ als Qualitätskontrolle für den Aufbau eines Radioimmunassays herangezogen werden kann.

Die Messung der RADIOAKTIVITÄTS-KINETIK nach Injektion gleicher Aktivitäten in Form von $^{57}\text{CoCl}_2$ bzw. $^{57}\text{Co-BLM}$ sowie die RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG der Kinetik von BLM in Leber und Niere führte zu folgenden Resultaten:

Die Organaktivität ist über dem gesamten Beobachtungszeitraum nach Applikation von $^{57}\text{CoCl}_2$, um ein Vielfaches höher als nach Applikation von $^{57}\text{Co-BLM}$ (Abb. 8).

Der unterschiedliche Radioaktivitätsverlauf nach Injektion von $^{57}\text{CoCl}_2$ und $^{57}\text{Co-BLM}$ während der II. Ausscheidungsphase macht deutlich, daß der Chelatkomplex in der Leber rascher dissoziiert als in der Niere (Tab. 7). Die Frage nach dem Ausmaß der Dissoziation ist mit dieser Untersuchung nicht zu treffen. Die ca. 4 - 5 mal kürzere Halbwertszeit der II. Ausscheidungsphase von $^{57}\text{Co(-BLM)}$ gegenüber $^{57}\text{Co(Cl}_2\text{)}$ läßt jedoch erkennen, daß noch ein Teil des $^{57}\text{Co}^{2+}$ an BLM oder dessen Metabolite gekoppelt die Leber verläßt.

Kobalt in ionisierter Form wird demgegenüber aus Niere und Leber etwa gleich schnell eliminiert. Mit Ausnahme der Retention von $^{57}\text{Co(Cl}_2\text{)}$ in der Niere zeigte sich im Bereich der I. Ausscheidungsphase kein großer Unterschied in der Elimination von $^{57}\text{Co(-BLM)}$ und $^{57}\text{Co(Cl}_2\text{)}$ in Leber und Niere. Daraus kann geschlossen werden, daß in dieser Phase noch keine stärkere Hydrolyse von $^{57}\text{Co-BLM}$ in der Leber gegenüber der Niere eingetreten ist.

Die immunreaktive Bestimmung von BLM im Homogenat zeigte einen deutlichen Unterschied in der Kinetik von $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ und immunologisch bestimmten BLM. In der Niere sinkt die Konzentration des immunreaktiven BLM von der 1. bis zur 2. Std. p.i. um den Faktor 14, dagegen sinkt die Radioaktivität nach Injektion von $^{57}\text{Co}-\text{BLM}$ im gleichen Zeitraum etwa um den Faktor 2. In der Leber ließ sich bereits 1 Std. p.i. kein immunologisch aktives BLM mehr nachweisen.

Dieses Ergebnis läßt zwei Schlußfolgerungen zu:

1. BLM wird in der Leber schnell abgebaut.
2. Beim radioimmunologischen Nachweis wird BLM während der notwendigen Inkubationszeit durch Enzymsysteme des Leberhomogenates weiter abgebaut. Diese Schwierigkeiten führten dazu, den Radioimmunassay als Meßmethode für die BLM-Bestimmung im Gewebe nicht weiter zu verfolgen.

Zeit p.i. [Std.]	Injektionslösung					
	$^{57}\text{CoCl}_2$		$^{57}\text{Co}-\text{BLM}$		BLM	
	Leber-	Nieren-	Leber-	Nieren-	Leber-	Nieren-homogenat
1	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00
2	0,56	0,72	0,50	0,60	0,00	0,07 ₄
4	0,54	0,46	0,31	0,41	0,00	0,00
8	0,55	0,28	0,27	0,31	0,00	0,00
25	0,44	0,25	0,16	0,23	0,00	0,00

Tabelle 20: Zusammenfassung der Radioaktivitäten bzw. immunologische Aktivitäten in Abhängigkeit von der Zeit p.i. von $^{57}\text{Co}(-\text{Cl}_2)$, $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ und BLM bezogen auf die Aktivitäten 1 Std. p.i.

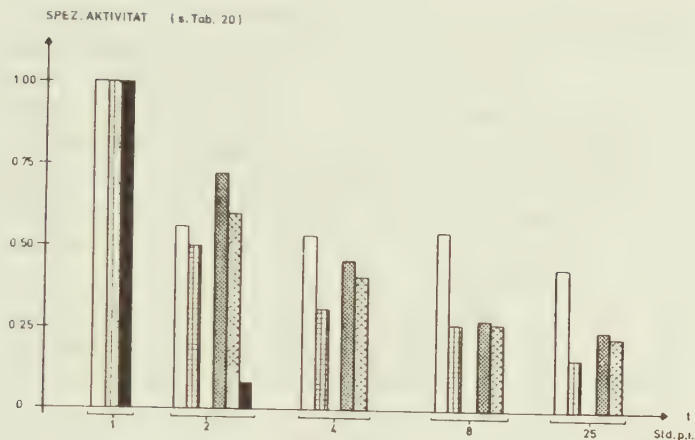
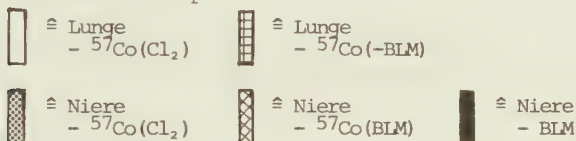


Abb. 17: Immunologische Aktivität von BLM bzw. Radioaktivität von $^{57}\text{Co}(\text{Cl}_2)$ und $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ bezogen auf die jeweiligen Aktivitäten 1 Std. p.i. in Abhängigkeit von der Zeit p.i.



Auch Ohnuma [25] beschrieb eine rasche Inaktivierung von BLM durch die Leber und konnte über einen BLM-Bioassay folgende Inaktivierungsreihe für BLM aufstellen:

Leber > Milz > Niere ≙ Plasma > Haut > Muskel.

Die Verhältnisse in der Lunge wurden von Ohnuma nicht untersucht, jedoch ist aufgrund des hohen Anteils epithelialer Strukturen ein ähnliches Verhalten wie in der Haut anzunehmen.

Weiterhin demonstriert die Arbeit von Renault et al. [27] in Leber und Niere eine erheblich schnellere Elimination von $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ als von $^{57}\text{Co}(\text{Cl}_2)$. Erst nach etwa 2 Tagen resultierte hier eine Phase gleich schneller Ausscheidung.

Nach dieser Zeit liegt also das gesamte Kobalt in freier Form bzw. an Proteine gebunden vor.

Müller et al. [23] isolierten aus Mäuseorganen ein BLM inaktivierendes Enzym. "Die BLM-inaktivierende Enzymaktivität ist in Extrakten aus Leber am höchsten, Hoden, Milz, Lunge und Gehirn weisen geringere Aktivitäten auf; in Hautgewebe fehlt dieses Enzym fast völlig." Umezawa [35] beschrieb ein BLM-inaktivierendes Enzym, das in-vitro nicht mit BLM in Kupferchelatform reagiert: "Bleomycin in Kupferchelatform wird aber nach Injektion genauso wie kupferfreies Bleomycin rasch inaktiviert. Dies läßt vermuten, daß das Kupferion des Bleomycins in Kupferchelatform in den Zellen leicht auf ein intrazelluläres metallbindendes Protein übertragen wird. Diese Untersuchungen lassen vermuten, daß Bleomycin ein effektiver Träger von Schwermetallen in die Zelle ist."

Nebenwirkungen einer Bleomycintherapie manifestieren sich vorwiegend in der Haut und in der Lunge [1], [6], [12], [13], [28]. Eine typische Lebersymptomatik wurde von den Therapeuten nicht beobachtet. Diese Befunde weisen ebenso wie die obigen Untersuchungsergebnisse auf die ausgeprägte Fähigkeit des Zytoplasmas der Leberzelle hin, BLM vor Erreichen des Zellkerns zu inaktivieren.

Die chemotherapeutische Wirkung des BLM wird auf Spaltung und Aufbruch der DNS-Doppelhelix zurückgeführt [34]. Angriffsort ist damit der Zellkern. Autoradiographische Untersuchungen [13] bestätigten eine erhöhte BLM-Konzentration am Zellkern gegenüber dem Zytoplasma.

Die eigenen Messungen zeigten, daß die Aktivitätsanreicherung im Zellkern nach Injektion von ^{57}Co -BLM gegenüber $^{57}\text{CoCl}_2$ in der Lunge etwa 12 mal und in der Niere etwa 10 mal größer als in der Leber ist (Tab. 11). Weiterhin stieg der relative Anteil der Radioaktivität der Kernfraktion der Lunge von 52 % der Homogenataktivität 30 min p.i. auf 84 % 27 Std. p.i. an (Tab. 14).

Ein Vergleich der Beladungsfähigkeit der Kernfraktionen vor und nach Abtrennen der übrigen Zellbestandteile macht den Einfluß der zytoplasmatischen Enzymaktivität besonders deutlich (Tab. 12 und 13). Bei Inkubation des Gesamthomogenates fand sich in der Leber eine ausgeprägt niedrigere Kernaktivität als in der Lunge. Demgegenüber ist die direkte Kernaffinität der Leberzellkerne zu $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ höher als die der Lungenkerne.

Um abzusichern, wie weit die beobachteten Phänomene durch eine Abspaltung des Kobalts aus dem ^{57}Co -BLM-Komplex bedingt sind, wurde eine weitere Versuchsserie mit ^{125}J -BLM durchgeführt.

Jodid geht mit BLM unter oxidativen Reaktionsbedingungen eine kovalente Bindung ein, die in vivo stabiler ist als die Chelatverbindungen des BLM [10], [24]. Nach Untersuchungen von Eckelmann et al. [10] dissoziiert die ^{125}J -BLM-Verbindung in vivo zwei Stunden nach Injektion erst zu 9 %. 85 min p.i. (Tab. 8 und 10) ist somit in guter Näherung die Anreicherung von ^{125}J -BLM der von BLM gleichzusetzen. Untersuchungen von Schulz und Haubold [30] ergaben, daß sich sowohl ^{125}J -BLM als auch ^{57}Co -BLM gegenüber Komplexbildnern wie EDTA und HSA (Human Serum Albumin) in vitro stabil verhält.

Abb. 18 zeigt eine zusammenfassende Gegenüberstellung der Homogenat- und Kernbeladungen mit $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ und $^{125}\text{J}(-\text{BLM})$ (s. Tab. 12 und 13).

$^{125}\text{J}(-\text{BLM})$ wurde in den drei untersuchten Homogenaten etwa gleich stark im Zellkern angereichert. Demgegenüber vermindert die zytoplasmatische Enzymaktivität der Leberzelle die Zellkernbeladung mit $^{57}\text{Co}(-\text{BLM})$ deutlich.

Insgesamt weisen die durchgeführten in-vivo- und in-vitro-Beladungen der Organe sowohl auf einen komplexen Abbau des BLM, als auch auf eine verstärkte Abkopplung des Nuklids bei der Beladung mit ^{57}Co -BLM hin.

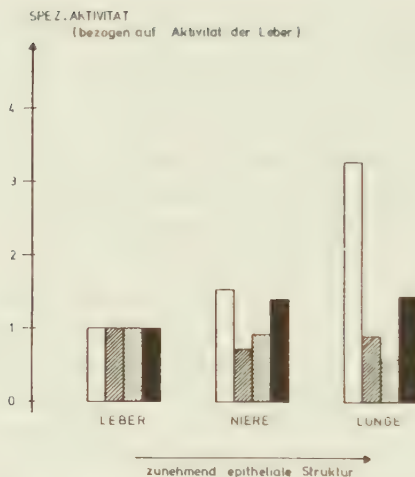


Abb. 18: In-vitro-Beladung von Homogenaten und Zellkernen mit ^{57}Co -BLM bzw. ^{125}J -BLM



Wegen der vielfältigen Einwirkungen des Zytoplasmas auf BLM und seiner markierten Verbindungen wurde das anfängliche Ziel des BLM-Nachweises in Organen mit Hilfe eines Radioimmunoassays aufgegeben. Es eröffnet sich jedoch andererseits wegen der beobachteten hohen Affinität der Zellkerne zu BLM die Möglichkeit zum Aufbau eines KERNREZEPTOR-ASSAYS für den BLM-Nachweis.

Vorversuche zeigten, daß:

1. die Kernbeladungskapazität linear mit Erhöhung des Kernemulsionsverdünnungsgrades anwächst (Abb.10) und
- daß 2. eine etwa 65%-ige Bindung des ^{57}Co (-BLM) bei Inkubation von 10^{-8} g ^{57}Co -BLM und 500 μl einer Kernemulsion mit dem Verdünnungsgrad 1 resultiert.

Davon ausgehend zeigten die aufgenommenen Standardkurven den erwarteten stetigen Abfall der kerngebundenen Aktivität B/T bis zu einer BLM-Standard-Konzentration von 10^{-6} g BLM/ml in TKM-Puffer (Abb. 11).

Für BLM-Konzentrationen größer als 10^{-6} g/ml zeigte sich für alle eingesetzten Kernemulsionen ein paradoxer Bindungsanstieg, der bei Einsatz von Lungenkernen ausgeprägter war als bei Einsatz von Leber- oder Nierenkernen.

Imura et al. [16] und Cresto et al. [7] berichteten über ähnliche paradoxe Bindungsphänomene bei ACTH-, Insulin- und STH-Radioimmunassays. Der dort beobachtete HOOK-EFFEKT zeigte eine Abhängigkeit von der Antikörperverdünnung und verschwand bei hoher Verdünnung. Imura interpretierte dieses Phänomen durch eine allosterische Interaktion von zweibindigen Antikörpern. Nach Absättigung der ersten Valenz soll eine erhöhte Affinität zum Antigen vorliegen. Diese Hypothese konnte durch Papain-Spaltung der Antikörper in zwei Fab-Fragmente bestätigt werden. Die einbindigen Fab-Fragmente zeigten im Radioimmunassay keinen paradoxen Bindungsanstieg. Antikörper, die nach nur kurzer Immunisierung gewonnen wurden, zeigten einen starken Hook-Effekt, dagegen verschwand der Effekt nach Erhöhung der Antikörperspezifität durch längere Immunisierungsverfahren.

Zusammenfassend tritt nach diesen Untersuchungen ein paradoxer Bindungsanstieg auf, wenn

1. hohe Antikörperkonzentrationen vorliegen
(zunächst Absättigung nur einer Valenz)

und 2. die eingesetzten Antikörper eine niedrige Spezifität gegenüber dem Antigen besitzen.

Der paradoxe Bindungsanstieg im Kernrezeptorassay (Abb. 11) bei Einsatz von ^{57}Co -markiertem Tracer legt die Vermutung nahe, daß durch eine Interaktion des BLM mit den Kern-

membranen die Affinität des kerngebundenen BLM zu $^{57}\text{Co}^{2+}$ erhöht wird. BLM-Kern-Komplexe würden somit freiem ^{57}Co -BLM das komplexierte $^{57}\text{Co}^{2+}$ entreißen, wodurch die gebundene Radioaktivität mit ansteigendem unmarkierten BLM-Angebot bis zum Erreichen eines neuen Gleichgewichtszustandes anwachsen würde. Die Anlagerung des BLM an den Kern verändert nach dieser Hypothese die Gleichgewichtskonstante der Reaktion zwischen BLM und $^{57}\text{Co}^{2+}$ zugunsten des Reaktionsproduktes.

Bei Einsatz von ^{125}J -markiertem Tracer (Abb. 12) ergab sich kein paradoxer Bindungsanstieg und somit keine Veränderung des Gleichgewichtes zwischen BLM und ^{125}Jod . Dieses Ergebnis wird durch die hohe Stabilität der kovalenten Bindung zwischen ^{125}Jod und BLM verständlich.

Der von Imura beschriebene Hook-Effekt im RIA ist im Prinzip auf gleiche Weise zu erklären, wenn auch die Reaktionsmechanismen etwas anders sind.

Die erreichte Empfindlichkeit der Kernrezeptor-Bindungskurve in Abb. 12 reicht zur BLM-Bestimmung bzw. zur Ermittlung von bereits in vivo an Kerne gebundenes BLM vorerst noch nicht aus. Es sind weitere Untersuchungen geplant, diesen im Prinzip funktionstüchtigen Kernrezeptor-Assay zur Anwendungsreife zu bringen.

Das Thema der Arbeit lautet: Untersuchungen zur Bleomycin-Bestimmung in Organen. Dieses Ziel wurde durch radioimmunologische BLM-Messungen in Organhomogenaten wegen der undefinierten Enzymaktivität der Homogenate während der Inkubationszeit nicht erreicht. Auch die BLM-Bestimmung in isolierten Zellkernfraktionen durch den Radioimmunoassay war wegen der hohen Bindungskapazität der Kerne gegenüber BLM nicht aussichtsreich (Tab. 15). Von diesen Ergebnissen ausgehend war die Entwicklung eines Kernrezeptor-Assays folgerichtig. Die durchgeführten Modellrechnungen zeigten, daß die Affinität der Homogenate und damit auch die der Kerne

zu BLM geringer ist als die der Serumantikörper der immunisierten Kaninchen. Ein Kernrezeptor-Assay muß daher auch bei einem optimalen Aufbau unspezifischer sein als ein Radioimmunassay. Bei der immunologischen BLM-Bestimmung in den Homogenaten zeigten sich in der Niere sehr geringe BLM-Konzentrationen. In der Leber konnte kein BLM nachgewiesen werden. Es besteht daher neben dem enzymatischen Abbau des BLM durch Homogenatenenzyme auch die Möglichkeit des Abbaus der Kaninchen-Serumantikörper. Die hohe Spezifität der Antikörper wäre damit nutzlos. Der eingeschlagene Weg des Aufbaus eines Kernrezeptor-Assays umgeht dieses letztere Problem.

ZUSAMMENFASSUNG

=====

Die Bestimmung der Organverteilung von Bleomycin (BLM) stößt auf methodische Schwierigkeiten. Der Radioimmunassay, der für die BLM-Bestimmung in Körperflüssigkeiten gut geeignet ist, wird durch die enzymatische Aktivität der Organhomogenate gestört. Die direkte Radioaktivitätsmessung nach Injektion von markiertem BLM, die eine Reihe von Autoren wegen der Einfachheit dieser indirekten Nachweismethode angewendet hat, setzt die Stabilität des injizierten Radiopharmakons in vivo über den Beobachtungszeitraum voraus. Eine deutliche Spaltung des in dieser Arbeit vorrangig untersuchten ^{57}Co -BLM-Chelatkomplexes wurde jedoch bereits 2 Stunden nach Injektion mit Einsetzen der langsamen Ausscheidungsphase beobachtet. Dieser enzymatische Abbau ist organabhängig und wurde in der Leber am stärksten beobachtet. ^{125}J -BLM zeigte ein anderes Verhalten, da Jod eine atomare Bindung mit BLM eingeht. Bedingt durch die stabile kovalente Bindung war nur eine geringe Organabhängigkeit des Speichervermögens für ^{125}J (-BLM) erkennbar. Die beobachtete hohe Affinität der untersuchten Organzellkerne zu BLM bzw. seiner markierten Verbindungen führte zum Aufbau eines Kernrezeptorassays. Hierdurch wurden die zytoplasmatischen Einflüsse auf die BLM-Bestimmung umgangen. Die Empfindlichkeit dieser hier entwickelten Meßmethode reichte bei Einsatz von ^{125}J -markiertem Tracer vorerst zur BLM-Bestimmung in Organen nach Injektion von pharmakologischen BLM-Dosen nicht aus. Jedoch wird mit diesem Verfahren ein prinzipieller Weg zur exakten Ermittlung der BLM-Kinetik im Zellkern, und damit am Ort der pharmakologischen Wirkung, aufgezeigt. Versuche zum Kernrezeptorassay mit ^{57}Co -BLM stellten eine Erhöhung der Affinität von BLM zu $^{57}\text{Co}^{2+}$ durch Bindung des BLM an den Zellkern heraus.

Die durchgeführte Modellrechnung zum Radioimmunassay zeigte, daß die durch Immunisierung von Kaninchen gewonnenen Antikörper gegen BLM-HSA-Konjugat der Gruppe der IgG-Globuline angehören, und daß die Organhomogenate gegenüber diesen Anti-

körpern eine schwache Bindung des BLM zeigen. Daraus folgt, daß auch bei optimiertem Aufbau ein Kernrezeptorassay unspezifischer bleibt als ein Radioimmunassay. Dennoch erscheint eine Weiterentwicklung des Kernrezeptorassays lohnenswert, da hierbei die prinzipiellen methodischen Schwierigkeiten der radioimmunologischen BLM-Bestimmung in Organen elegant umgangen werden.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- =====
- [1] Baumberger, K.
Bleomycin - Lungenfibrosen
Schweiz. med. Wschr. 104: 329 (1974)
- [2] Bier, J.; Loer, E.; Franke, J. und Platz, H.
Tierexperimentelle Untersuchungen zur intraarteriellen
Chemotherapie mit Bleomycin
Arch. Otorhinolaryngol. 228: 271 (1980)
- [3] Bier, J.; Benders, P. und Bitter, K.
Ausscheidung und Organverteilung von ⁵⁷Co-Bleomycin
Dtsch. Z. Mund-Kiefer-Gesichtschir. 3: 151 (1979)
- [4] Bitter, K.
Pharmacokinetic behaviour of bleomycin-Cobalt-57 with
special regard to intraarteriell perfusion of the
maxillofacial region
J. max-fac Surg. 4: 226 (1976)
- [5] Blobel, G. und Potter, V.R.
Nuclei from Rat Liver: Isolation Method That Combines
Purity with High Yield
Science 154: 1662 (1966)
- [6] Brehm, G.
Dermatologische Gesichtspunkte zur zytostatischen
Behandlung mit Bleomycin
1. Dtsch. Bleomycin-Symposium
Wilmanns ed., Stuttgart 1975
- [7] Cresto, J.C. und Yalow, R.S.
Anomalously Ascending Standard Curves in the Radioimmuno-
assay of Insulin, Human Growth Hormon and ACTH
in "Radioimmunoassay: Methodology and Applications in

Physiology and in clinical Studies".

Levine, R. und Pfeiffer, E.F. eds., Thieme, Stuttgart
1975

- [8] Desbuquois, B. und Aurbach, G.D.
Use of polyethylen glycol to separate free and anti-
body-bound peptide hormones in radioimmunassay
J. clin. Endocr. 33: 732 (1971)
- [9] Dulce, H.J.
Klin. chem. Diagnostik
Urban & Schwarzenberg, Berlin-München-Wien 1973
- [10] Eckelmann, W.C.; Kubota, H.; Siegel, B.A.; Komai, T.;
Rzeszutowski, W.J. und Reba, R.C.
Iodinated Bleomycin: An unsatisfactory Radiopharma-
ceutical for Tumor Localization
J. Nucl. Med. 17: 385 (1976)
- [11] Elson, M.K.; Oken, M.M. und Shafer, R.B.
A Radioimmunassay for Bleomycin
J. Nucl. Med. 18: 296 (1977)
- [12] Fritsch, H.; Drings, P. und V. Fournier, D.
Klinische Erfahrungen mit Bleomycin bei verschiedenen
metastasierenden Tumoren
1. Dtsch. Bleomycin-Symposium
Wilmanns ed., Stuttgart 1975
- [13] Fujimoto, J.
Radioautographic Studies on the Intracellular Distri-
bution of Bleomycin - ^{14}C in Mouse Tumor Cells
Cancer Research 34: 2969 (1974)
- [14] Gharib, H.; Ryan, R.J. und Mayrerry, W.E.
Radioimmunassay for triiodothyronine (T_3): Affinity
and specificity of the antibody to T_3 ,
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 509 (1971)

- [15] Grove, R.B.; Eckelmann, W.C. und Reba, R.C.
Distribution of Labeled Bleomycin in Normal and Tumor-
Bearing Rats
J. Nucl. Med. 14: 917 (1975)
- [16] Imura, H.; Nakai, Y.; Madsukura, S. und Hirata, Y.
in "Radioimmunoassay: Methodology and Applications in
Physiology and in Clinical Studies"
Levine, R. und Pfeiffer, E.F. eds.
The Paradoxical Binding Phenomenon in Radioimmunoassay of
ACTH
Thieme Stuttgart 1974
- [17] Jawetz, E.
Medizinische Mikrobiologie - 3. Aufl.
Springer, Berlin 1973
- [18] Merétey, K. und Kocsár, L.T.
Some Problems of Specific Antibody Production in Radio-
immunoassay Techniques
Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine
Vol. I, p. 23, IAEA, Wien 1974
- [19] Kaul, A.; Oeff, K.; Roedler, H.D. und Vogelsang, T.
Radiopharmaka-Biokinetische Daten und Ergebnisse von
Neuberechnungen der Strahlendosis
Informationsdienst für Nuklearmedizin FUB
Berlin 1973
- [20] Kobayashi, T.
Reduced Activity of DNA-Polymerase prepared from
Bleomycin-treated Cancer Cells
J. Antibiotics 24: 519 (1971)
- [21] Lehninger, A.L.
Biochemie
Verlag Chemie, Weinheim, 1975

- [22] Müller, W.E.G.; Todsuka, A.; Zahn, R.K. und Umezawa, H.
Wirkungsweise des Zytostatikums BLEOMYCIN - Einfluß
auf isolierte Enzymsysteme und auf Zellen in vitro und
in vivo
1. Dtsch. Bleomycin-Symposium in München
Willmanns ed., Stuttgart 1975
- [23] Müller, W.E.G.; Toszuka, A. und Zahn, R.K.
Methode zur Bestimmung der Bleomycin-inaktivierenden
Enzymaktivität im Gewebe
Z. Krebsforsch. 83: 151 (1975)
- [24] Nunn, A.D.
The Relative Stability of Bleomycin Metal Complexes to
Metal Exchange
Eur. J. Nucl. Med. 2: 43 (1977)
- [25] Ohnuma, T.; Holland, J.F.; Masuda, H.; Waligunda, J.A.
und Goldberg, G.A.
Microbiological assay of Bleomycin:
Inactivation, Tissue Distribution and Clearance
Cancer 33: 1230 (1974)
- [26] Potter, V.R. und Elvehjem, C.A.
Pistill-Homogenisator
J. biol. Chem. 114: 495 (1936)
- [27] Renault, H.; Henry, R.; Rapin, J. und Hegesippe, M.
Chélation de cations radioactifs par un polypeptide:
La bléomycin
in "Radiopharmaceuticals and Labelled Compounds" -
Vol. II, p. 195, IAEA 1973
- [28] Roujeau, J.; Narcy, P.; Marsan, C. und Trotoux, J.
Fibrose Pulmonaire et Bléomycine
Sém. Hôp. Paris 49: 1989 (1973)

- [29] Rodbard, D.; Bridson, W. und Rayford, P.L.
Rapid calculation of radioimmunoassay results
J. Lab. Clin. Med. 74: 770 (1969)
- [30] Schulz, E. und Haubold, U.
Markierung von Bleomycin mit verschiedenen Nukliden
in "Nuklearmedizin und Biokybernetik", Vol. II, p. 614
Oeff, K. und Schmidt, H.A.E., eds., Berlin 1978
- [31] Struck, H.J.
Experimentelle Medizin
Thieme, Stuttgart 1973
- [32] Suzuki, H.
On the mechanism of action of Bleomycin: Scission of
DNA Strands in vitro and in vivo
J. Antibiotics 22: 446 (1969)
- [33] Tragl, K.H.; Angelberger, P.; Pils, P.; Hruby, R. und
Deutsch, E.
Distribution of ⁶⁴Cu-Bleomycin in Normal and Tumor
Bearing Rats
Europ. J. Cancer 12: 19 (1976)
- [34] Umezawa, H.
Chemistry and mechanism of action of bleomycin
Federation Proceedings 33: 2296 (1974)
- [35] Umezawa, H.
Chemie und Wirkungsmechanismus von Bleomycin
1. Dtsch. Bleomycin-Symposium
Willmanns ed., Stuttgart 1975
- [36] Vaitukaitis, J.; Robbins, J.B.; Niessschlag, E. und
Ross, G.T.
A method of producing specific antisera with small
dose of immugen
J. Clin. Endocr. 33: 988 (1971)

- [37] Williams, E.D.; Merrick, M.V. und Lavender, J.P.
The distribution and dosimetry of ^{111}In -Bleomycin in
man
Brit. J. Radiology 48: 275 (1975)
- [38] Zimmermann, M. und Hale, T.
Verteilungsstudie mit ^{57}Co -, ^{51}Cr -, ^{111}In - und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -
Bleomycin in Mäusen mit einem soliden Ehrlich-Karzinom
Nucl. Med. 15: 176 (1976)

Die vorliegende Arbeit wurde im Isotopenlabor des Universitätsklinikums Charlottenburg in Berlin in der Zeit von April 1979 bis Juli 1981 angefertigt.

Für die Auswahl des Themas und die wertvolle Unterstützung danke ich Herrn Professor U. Haubold.

Ebenso gilt meine dankbare Verbundenheit Herrn E. Schulz für viele Anregungen und Diskussionen sowie allen Mitarbeitern des Isotopenlabors.

LEBENS LAUF
=====

Geburtsdatum: 24. Januar 1950

Geburtsort: Spreeau

Vater: Otto Rüdinger, selbständiger Steinmetzmeister

Mutter: Hildegard Rüdinger, geb. Merten

Wohnort: 1000 Berlin 41, Schöneberger Str. 6

Ausbildung: GRUNDSCHULE in Berlin von 1956 bis 1961,
GYMNASIUM mit Ablegen des Abiturs 1969 am
Herder-Gymnasium in Berlin
CHEMIESTUDIUM an der Technischen Universität
Berlin von 1969 bis 1975
DIPLOMVORPRÜFUNG 1972, DIPLOMPRÜFUNG 1974
PROMOTION unter Anleitung von Herrn Prof.
J. Springer und Herrn Prof. R. Hosemann am
Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesell-
schaft in Berlin
Thema: "Über den Einfluß des Schergefälles
auf die Struktur von Kettenmolekülen"
PROMOTIONSPRÜFUNG: 3. August 1977
MEDIZINSTUDIUM an der Freien Universität
Berlin seit 1975
ÄRZTLICHE VORPRÜFUNG im August 1977
ERSTER ABSCHNITT DER ÄRZTLICHEN PRÜFUNG im
August 1978
ZWEITER ABSCHNITT DER ÄRZTLICHEN PRÜFUNG im
August 1980
Beginn der vorliegenden PROMOTIONSARBEIT
unter Anleitung von Herrn Prof. U. Haubold
im Isotopenlabor des Klinikums Westend im
April 1979

Heirat: 30. August 1980 in Ménerbes (Frankreich-
Provence) mit Martine Waltisperger

Wolfgang Rüdinger

